

Garro, Ariel Gustavo

Caracterización de micelas de gangliósidos modificadas con moléculas de reconocimiento celular como estrategia de direccionamiento de fármacos

**Tesis para la obtención del título de posgrado de
Doctor en Bioquímica**

Director: Beltramo, Dante Miguel

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.



Esta obra está bajo licencia 2.5 de Creative Commons Argentina.
Atribución-No comercial-Sin obras derivadas 2.5

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Químicas

**Caracterización de micelas de
gangliósidos modificadas con moléculas
de reconocimiento celular como
estrategia de direccionamiento de
fármacos**

**Trabajo Final de Tesis Doctoral conforme a los requisitos de la Facultad
de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba para obtener
el título de Doctor en Bioquímica**

por

Ariel Gustavo Garro

Córdoba, Argentina

2017

COMISIÓN ASESORA DE TESIS

- **Dr. Dante M. Beltramo (Director de tesis):** CEPROCOR (Centro de Excelencia en Productos y Procesos Córdoba) - Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Prov. de Córdoba- Sede Santa María de Punilla, Córdoba; Investigador Principal-CONICET.

- **Dra. Roxana Alasino (Co-directora de tesis):** CEPROCOR (Centro de Excelencia en Productos y Procesos Córdoba)- Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Prov. de Córdoba- Sede Santa María de Punilla, Córdoba.

- **Dra. Mabel Yudi:** INFIQC (Instituto de Investigaciones en Físico-Química de Córdoba); CCT-CONICET - CORDOBA (Centro Científico Tecnológico- CONICET – CORDOBA); Investigadora Principal-CONICET.

- **Dr. Gastón Soria:** CIBICI (Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología)- UNC-Córdoba; Profesor Asistente-UNC, Investigador Adjunto-CONICET.

- **Dr. Gustavo Baiardi:** IIBYT (Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas - CCT-CONICET - CORDOBA (Centro Científico Tecnológico- CONICET – CORDOBA); Profesor Asistente-Investigador Adjunto- CONICET.

COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS

-Dra. Eder L. Romero (evaluadora externa)

Dra. en Ciencias Exactas por la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. Profesora: Centro de Investigación y Desarrollo de Nanomedicinas (CIDE N) de la Universidad Nacional de Quilmes. Investigadora Principal-CONICET.

- Dra. Mabel Yudi

- Dr. Gastón Soria

A mi familia,
en especial a Erica,
Luca, Luana,
mami y Miguel.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dante por convencerme de que podía cumplir el sueño de doctorarme. Quiero destacar además, no sólo su enorme conocimiento y capacidad académica, sino su vocación para enseñar, motivar, discutir, acompañar e inculcar la perseverancia e imaginación para encontrar soluciones a los desafíos que se presentan. Gracias por todo eso y mucho más.

Muchas gracias Toti, por dirigir y acompañarme día a día en este proyecto. Valoro mucho tus consejos y tu forma de bajar a tierra las teorías o interpretaciones de Dante. Siempre predispuesta y con la mejor voluntad para colaborar y hacer.

A mis compañeros del CEPROCOR, en particular a Valeria, Vicky, Karina, Adrián y Marcelo por hacer del trabajo un lugar agradable, con el mejor clima. Gracias por la generosidad y el aporte de cada uno. Todo resulta más fácil cuando se trabaja con gente como ustedes. Ismael, lo mismo para vos. Gracias por tus consejos y experiencia.

A mi madre, mi principal ejemplo de esfuerzo y sacrificio, gracias por invertir toda tu vida en nosotros, especialmente en la educación. A Miguel, por desempeñar muchas veces la función de padre más que de hermano.

En especial, a Erica por ser la mejor compañera del mundo, por estar a mi lado siempre, por apoyar incondicionalmente mis decisiones, por aguantarme. Por la familia que formamos, lo mejor que tengo. A Luca y Luana, gracias por ser mis hijos.

A los integrantes de la comisión asesora, por sus observaciones y consejos siempre constructivos, que contribuyeron a mejorar este trabajo.

Por último, quiero agradecer al CEPROCOR, Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba, por permitir mi desarrollo personal y a la Universidad Católica de Córdoba por aceptarme y hacer posible la realización de esta Tesis.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Lista de Abreviaturas	xii
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tablas	xix
Resumen	xxi
Summary	xxiii
1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cáncer	1
1.2 Tratamientos	3
1.3 Nanotransportadores	5
1.4 Nanotransportadores Funcionalizados con Ligandos	15
2.ANTECEDENTES	21
3.OBJETIVOS	26
4.CAPÍTULO 1	28
4.1 Resumen	28
4.2 Introducción	29
4.3 Materiales y Métodos	31
4.3.1 Materiales	31
4.3.2 Métodos	31
4.3.2.1 Conjugación de la espermidina a las micelas de GM ₁	31
4.3.2.2 Eficiencia de las micelas de GM ₁ -espermidina en la carga de Ptx	32
4.3.2.3 Eficiencia de las micelas de GM ₁ -espermidina en la encapsulación de Doxo	33
4.3.2.4 Determinación de la concentración de gangliósidos	33
4.3.2.5 Caracterización físico-química de las micelas GM ₁ -espermidina	34
4.3.2.5.1 Tamaño y Distribución de partícula	34
4.3.2.5.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	34
4.3.2.5.3 Determinación de la carga neta superficial de las micelas GM ₁ -espermidina	34
4.3.2.5.4 Cromatografía de exclusión por tamaño	35

4.3.2.6 Citotoxicidad <i>in vitro</i> de los fármacos vehiculizados en micelas GM ₁ -espermidina	35
4.4 Resultados	36
4.4.1 Modificación de la superficie de micelas de GM ₁ con espermidina	36
4.4.2 Caracterización de las micelas GM ₁ -espermidina	37
4.4.3 Capacidad de las micelas GM ₁ -espermidina de encapsular fármacos	38
4.4.4 Actividad biológica <i>in vitro</i> de la Doxo cargada en micelas GM ₁ -espermidina	41
4.5 Discusión	44
4.6 Conclusión	46
5.CAPÍTULO 2	47
5.1 Resumen	47
5.2 Introducción	48
5.3 Materiales y Métodos	51
5.3.1 Materiales	51
5.3.1.1 Reactivos	51
5.3.1.2 Líneas celulares	52
5.3.2 Métodos	52
5.3.2.1 Preparación de micelas de GM ₁ con anticuerpos IgG	52
5.3.2.2 Caracterización de los complejos GM ₁ -IgG	53
5.3.2.2.1 Análisis cromatográficos	53
5.3.2.2.2 Análisis por SDS-PAGE nativo	53
5.3.2.2.3 Determinación de la concentración de IgG	54
5.3.2.2.4 Tamaño y distribución de partícula	54
5.3.2.2.5 Microscopía electrónica de transmisión	54
5.3.2.2.6 Determinación de la carga neta superficial de las micelas GM ₁ -IgG	54
5.3.2.3 Determinación de la eficiencia de los complejos GM ₁ -IgG para cargar fármacos	55
5.3.2.4 Reconocimiento antigénico de los anticuerpos unidos a las micelas de GM ₁	55
5.3.2.4.1 Citometría de flujo	55
5.3.2.4.2 Inmunoensayo quimioluminiscente	56

5.3.2.4.3 Inmunohistoquímica	56
5.3.2.5 Evaluación de la expresión de receptores específicos en células <i>in vitro</i> e interacción con GM ₁ -IgG anti Receptor	57
5.3.2.6 Citotoxicidad <i>in vitro</i> de complejos GM ₁ -IgG/fármaco	57
5.4 Resultados	58
5.4.1 Caracterización de la interacción GM ₁ -IgG	58
5.4.2 Caracterización físico-química de los complejos GM ₁ -IgG	65
5.4.3 Eficiencia de los complejos GM ₁ -IgG en la encapsulación de fármacos	67
5.4.4 Actividad biológica de los anticuerpos asociados a la superficie de las micelas de GM ₁	68
5.4.5 Expresión de receptores superficiales en células <i>in vitro</i> e interacción con GM ₁ -IgG anti Receptor	71
5.4.6 Citotoxicidad <i>in vitro</i> de los complejos GM ₁ -IgG/fármaco	72
5.5 Discusión	74
5.6 Conclusión	77
6.CAPÍTULO 3	78
6.1 Resumen	78
6.2 Introducción	79
6.3 Materiales y Métodos	82
6.3.1 Materiales	82
6.3.2 Métodos	83
6.3.2.1 Obtención y purificación de las lipoproteínas LDL y HDL	83
6.3.2.2 Determinación de la concentración de la fracción LDL y HDL purificadas	84
6.3.2.3 Preparación de los complejos GM ₁ -lipoproteínas	85
6.3.2.4 Cuantificación de la LDL y HDL asociada a las micelas de GM ₁	85
6.3.2.5 Caracterización de los complejos GM ₁ -lipoproteínas	85
6.3.2.5.1 Electroforesis en gel de agarosa	86
6.3.2.5.2 Determinación del tamaño de partícula y el Potencial zeta	86
6.3.2.5.3 Microscopía electrónica de transmisión	86

6.3.2.6 Incorporación de Ptx o Doxo en los complejos GM ₁ -lipoproteína	87 ^x
6.3.2.6.1 Determinación de la concentración de Ptx	87
6.3.2.6.2 Determinación de la concentración de Doxo	87
6.3.2.7 Citotoxicidad <i>in vitro</i> de los complejos GM ₁ -lipoproteína/fármaco	87
6.3.2.8 Efecto de la liofilización	88
6.4 Resultados	89
6.4.1 Interacción de las micelas de GM ₁ con las LDL y HDL	89
6.4.2 Cantidad de LDL o HDL asociada a las micelas de GM ₁	95
6.4.3 Preparación de complejos solubles de GM ₁ -LDL o GM ₁ -HDL cargados con Ptx o Doxo	99
6.4.4 Caracterización de los complejos GM ₁ -LDL	103
6.4.5 Efecto citotóxico <i>in vitro</i> de los complejos GM ₁ - LDL/fármaco	105
6.4.6 Efecto de la liofilización	112
6.5 Discusión	113
6.6 Conclusión	116
7. CAPÍTULO 4	118
7.1 Resumen	118
7.2 Introducción	119
7.3 Materiales y Métodos	121
7.3.1 Materiales	121
7.3.1.1 Reactivos	121
7.3.1.2 Líneas celulares	122
7.3.2 Métodos	122
7.3.2.1 Incorporación directa del AF en las micelas de GM ₁	122
7.3.2.2 Conjugación del AF a las micelas de GM ₁	122
7.3.2.3 Conjugación del AF a la Albúmina	122
7.3.2.4 Preparación de micelas de GM ₁ con Albúmina conj-AF	124
7.3.2.5 Caracterización de las micelas de GM ₁ modificadas con AF	124
7.3.2.5.1 Tamaño y distribución de partícula	124
7.3.2.5.2 Determinación de la carga neta superficial de las micelas modificadas	124
7.3.2.5.3 Análisis cromatográficos	125

7.3.2.6 Incorporación de Ptx o Doxo en las micelas de GM ₁ modificadas con AF	125
7.3.2.7 Citotoxicidad <i>in vitro</i> de las micelas GM ₁ -AF/fármaco	125
7.4 Resultados	126
7.4.1 Preparación de micelas de GM ₁ modificadas con AF	126
7.4.2 Incorporación de fármacos en las micelas de GM ₁ modificadas con AF	130
7.4.3 Caracterización de las micelas de GM ₁ modificadas con AF	132
7.4.4 Efecto citotóxico <i>in vitro</i> de las micelas de GM ₁ modificadas con AF	135
7.5 Discusión	135
7.6 Conclusión	137
8. CONCLUSIONES	138
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

LISTA DE ABREVIATURAS

- AF:** Ácido Fólico
- AH:** Ácido Hialurónico
- Alb:** Albúmina sérica humana
- BHE:** Barrera Hemato-Encefálica
- BHL:** Balance Hidrofílico-Lipofílico
- CD:** Ciclodextrina
- CMC:** Concentración Micelar Crítica
- DO:** Densidad Óptica
- Doxo:** Doxorubicina
- DLS:** Dynamic Light Scattering: Dispersión de luz dinámica
- DM:** Diámetro Medio
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- Dtx:** Docetaxel
- EDC:** 1-[3-dimetil amino propil]-3-etilcarbodiimida
- EPR:** Enhanced Permeability and Retention: Permeabilidad y retención aumentada
- GM₁:** Monosialogangliósidos
- HDL:** Lipoproteína de alta densidad
- HPLC:** High Pressure Liquid Chromatography: Cromatografía líquida de alta presión
- IHC:** Inmunohistoquímica
- IP:** Índice de Polidispersidad
- LDL:** Lipoproteína de baja densidad
- MC-540:** Merocianina 540
- MDR:** Multidrug resistance: Resistencia a múltiples drogas
- MEM:** Medio esencial mínimo
- MgCl₂:** Cloruro de Magnesio
- NaPhT:** Fosfotungstato de Sodio
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- OPD:** Ortofenilendiamina
- PBS:** Buffer fosfato salino
- PEG:** Polietilenglicol

PTS: Polyamine Transport System: Sistema de transporte de poliaminas

Ptx: Paclitaxel

PUT: Putrescina

QM: Quilomicrones

RF: Receptor de Folatos

RLDL: Receptor de lipoproteínas de baja densidad

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

SPD: Espermidina

SPM: Espermina

SRE: Sistema Retículo Endotelial

TEM: Transmission electron microscopy: Microscopía electrónica de transmisión

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

LISTA DE FIGURAS

	Página
INTRODUCCIÓN	
Figura 1: Características distintivas de las células cancerosas.	2
Figura 2: Investigación terapéutica de nuevos fármacos.	4
Figura 3: Representación de nanotransportadores diseñados para el transporte y liberación de fármacos.	6
Figura 4: Ilustración esquemática de la biodistribución selectiva de los nanotransportadores inyectados por vía intravenosa mostrando la acumulación en tumores debido al efecto EPR, absorción por el sistema SRE y excreción por el riñón.	10
Figura 5: Diferencias entre los tejidos normales y los tumorales que explican la acumulación pasiva de los nanotransportadores debido al efecto EPR.	11
Figura 6: Acumulación pasiva. Representación esquemática del mecanismo de biodistribución selectiva por el efecto de permeabilidad y retención aumentada.	11
Figura 7: Ejemplos de funcionalización de nanotransportadores.	14
Figura 8: Biodistribución activa. Representación esquemática del mecanismo de transporte activo, mediante el cual el nanomedicamento puede liberar el fármaco selectivamente en el tejido tumoral.	17
ANTECEDENTES	
Figura 9: Estructura básica de los gangliósidos.	21
Figura 10: Esquema representativo de la formación de micelas a partir de moléculas anfifílicas.	22
Figura 11: Estructura química del gangliósido GM ₁ .	23
CAPÍTULO 1	
Figura 12: Método de conjugación mediado por grupos carboxílicos.	36
Figura 13: Micrografía electrónica de: (A) micelas de GM ₁ y (B) micelas de espermidina-GM ₁ .	38
Figura 14: Capacidad de las micelas de GM ₁ -espermidina y GM ₁	39

para incorporar fármacos.

- Figura 15:** Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM₁ y GM₁-espermidina con Doxo. 40
- Figura 16:** Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas GM₁-espermidina con diferentes cantidades de Doxo. 41
- Figura 17:** Efecto citotóxico *in vitro* de las micelas de GM₁/Doxo y GM₁-espermidina/Doxo sobre células Hep-2. 42
- Figura 18:** Efecto citotóxico *in vitro* de las micelas GM₁-espermidina/Doxo sobre células Hep-2 pre-tratadas con 10 µg.ml⁻¹ de espermidina, micelas de GM₁-espermidina y GM₁ antes de la incubación. 43
- Figura 19:** Efecto citotóxico *in vitro* de las micelas GM₁-espermidina/Doxo sobre células Hep-2, en dos condiciones de temperatura y concentración. 44

CAPÍTULO 2

- Figura 20:** Estructura de un anticuerpo típico. 48
- Figura 21:** Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM₁ incubadas con IgG a diferentes pH. 59
- Figura 22:** Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM₁ incubadas con IgG a diferentes temperaturas. 60
- Figura 23:** Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM₁ incubadas con IgG a diferentes tiempos. 60
- Figura 24:** Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM₁ incubadas con IgG en diferentes condiciones. 61
- Figura 25:** Micelas de GM₁ incubadas con cantidades crecientes de IgG. 62
- Figura 26:** Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM₁-IgG incubadas con Alb a pH 4,5. 63
- Figura 27:** Electroforesis SDS-PAGE nativo de micelas GM₁/IgG 64

incubadas con diferentes cantidades de albúmina (HSA) a pH 4,5.

- Figura 28:** Perfil de elución obtenido mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM₁-IgG incubadas con Albúmina a pH 7,4. 65
- Figura 29:** Micrografía electrónica de las micelas de GM₁ calentadas a 55°C y las micelas mixtas de GM₁-IgG. 67
- Figura 30:** Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM₁ incubadas con anticuerpos IgG anti-Rub y Electroforesis SDS-PAGE nativo de las alícuotas de elución. 70
- Figura 31:** Imágenes de inmunohistoquímica de secciones de tejidos tumorales humanos incubados con: el anticuerpo monoclonal primario anti-Her2/neu. 71
- Figura 32:** Efecto citotóxico *in vitro* de GM₁-IgG anti-CD44/Doxo, GM₁/Doxo y GM₁-IgG total/Doxo sobre células H1299. 73

CAPÍTULO 3

- Figura 33:** Estructura y clasificación de las lipoproteínas según la separación por ultracentrifugación a diferentes densidades características para cada familia lipoproteica. 80
- Figura 34:** Electroforesis en geles de agarosa al 0,7% de LDL y HDL incubada con cantidades crecientes de GM₁ a pH 5,5 y 37°C. 90
- Figura 35:** Efecto de la temperatura sobre la interacción entre GM₁ y LDL. 91
- Figura 36:** Electroforesis en geles de agarosa al 0.7%. Perfiles de migración de micelas de GM₁ incubadas con LDL a diferentes temperaturas. 92
- Figura 37:** Efecto de la temperatura sobre la interacción entre GM₁ y HDL. 92
- Figura 38:** Electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. Perfiles de migración de micelas de GM₁ incubadas con HDL a diferentes temperaturas. 93
- Figura 39:** Electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. Perfiles de migración de micelas de GM₁ incubadas con LDL a diferentes pHs. 94

Figura 40: Electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. Perfiles de migración de LDL incubada con cantidades crecientes de micelas de GM ₁ .	96
Figura 41: Electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. Perfiles de migración del colorante Sudan Black y Sudan Black con crecientes de micelas de GM ₁ .	97
Figura 42: Cuantificación de lipoproteínas solubles asociadas a micelas de GM ₁ determinado con MC 540, después de incubar con GM ₁ durante 4h a 37°C, precipitar con TCA y clarificar por centrifugación.	98
Figura 43: Cuantificación de la LDL asociada a micelas de GM ₁ y micelas de GM ₁ cagada con Ptx.	100
Figura 44: Incorporación de Ptx en los complejos GM ₁ -LDL preparados a distintas temperaturas.	101
Figura 45: Incorporación de Ptx en los complejos GM ₁ -HDL preparados a distintas temperaturas.	102
Figura 46: Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de GM ₁ -LDL con diferentes cantidades de Doxo.	103
Figura 47: Micrografía electrónica de: micelas de GM ₁ y micelas de GM ₁ modificadas con LDL.	104
Figura 48: Efecto citotóxico <i>in vitro</i> de las micelas de GM ₁ /Doxo sobre células Hep-2.	105
Figura 49: Efecto citotóxico <i>in vitro</i> de GM ₁ -LDL, GM ₁ /Doxo y GM ₁ LDL/Doxo sobre células Hep-2 a 1, 2 y 3 h de incubación.	106
Figura 50: Efecto citotóxico <i>in vitro</i> de GM ₁ -LDL, GM ₁ -Doxo y GM ₁ -LDL/Doxo sobre células Hep-2 a 8 h de incubación.	107
Figura 51: Efecto citotóxico <i>in vitro</i> de GM ₁ -LDL, GM ₁ /Ptx y GM ₁ /Ptx LDL sobre células Hep-2 después de 24 h de incubación.	107
Figura 52: Imágenes obtenidas por microscopía óptica del efecto citotóxico <i>in vitro</i> del Ptx cargado en GM ₁ /Ptx y GM ₁ /Ptx DL sobre células Hep-2.	108
Figura 53: Efecto citotóxico <i>in vitro</i> de GM ₁ /Doxo y GM ₁ -LDL/Doxo después de 1, 2 y 3 h de incubación sobre células Hep-2, en dos condiciones de temperatura.	109

Figura 54: Efecto citotóxico <i>in vitro</i> de GM ₁ /Doxo y GM ₁ -LDL/Doxo sobre células Hep-2, preincubadas durante 4h con un exceso de LDL.	110
Figura 55: Efecto citotóxico <i>in vitro</i> de GM ₁ /Doxo y GM ₁ -LDL/Doxo sobre células Hep-2, coincubadas con un exceso de LDL.	111
Figura 56: Efecto citotóxico <i>in vitro</i> de Doxo, GM ₁ /Doxo y GM ₁ -LDL/Doxo sobre células Vero.	112
Figura 57: Efecto citotóxico <i>in vitro</i> de GM ₁ -LDL/Doxo preparada en el día y GM ₁ -LDL/Doxo liofilizada, almacenada durante 4 meses a 4°C y reconstituida antes de usar sobre células Hep2.	113

CAPÍTULO 4

Figura 58: Incorporación directa de cantidades crecientes de AF disuelto en DMSO, en las micelas de GM ₁ .	127
Figura 59: Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM ₁ incubadas con Alb y Alb conj-AF.	130
Figura 60: Micrográficas electrónicas de: micelas de GM ₁ , micelas de GM ₁ conj-AF, micelas de GM ₁ -Alb conj-AF, micelas de GM ₁ /Ptx-Alb conj-AF y micelas de GM ₁ -Alb conj-AF/Doxo.	134
Figura 61: Efecto citotóxico <i>in vitro</i> de GM ₁ /Doxo y GM ₁ -Alb conj-AF/Doxo sobre células B16 RF (+).	135

LISTA DE TABLAS

	Página
INTRODUCCIÓN	
Tabla I: Ventajas y desventajas de los principales sistemas nanotransportadores de fármacos	7
CAPÍTULO 1	
Tabla II: Características físico-químicas de las micelas GM ₁ y GM ₁ -espermidina	37
CAPÍTULO 2	
Tabla III: Características físico-químicas de las micelas de GM ₁ y las micelas de GM ₁ modificadas con IgG	66
Tabla IV: Incorporación de Ptx en micelas de GM ₁ antes de ser incubadas con IgG y con micelas de GM ₁ previamente incubadas con IgG, a distintas relaciones molares GM ₁ -IgG	68
Tabla V: Análisis por citometría de flujo de micelas GM ₁ cargadas con una combinación de anticuerpos monoclonales fluorescentes	69
Tabla VI: Prueba IMMULITE 2000 para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG contra el virus de la rubeola	70
Tabla VII: Determinación colorimétrica semicuantitativa de la expresión superficial de receptores de superficie en células <i>in vitro</i> HeLa, H1299, Hep-2 y B16	72
CAPÍTULO 3	
Tabla VIII: Incorporación de Ptx en micelas de GM ₁ previamente incubadas con LDL y con micelas de GM ₁ antes de ser incubadas con LDL, a distintas relaciones de masas GM ₁ /LDL	99
Tabla IX: Características fisicoquímicas de las LDL, micelas de GM ₁ y micelas de GM ₁ asociadas con LDL	104

CAPÍTULO 4

Tabla X:	Cuantificación del AF unido a micelas de GM ₁ pre y pos-diálisis	128
Tabla XI:	Eficiencia de la conjugación del AF a la Albúmina sérica humana por EDC, a diferentes relaciones molares Alb/AF	129
Tabla XII:	Incorporación de Ptx en micelas de GM ₁ previamente incubadas con Alb conj-AF y en micelas de GM ₁ antes de ser incubadas con Alb conj-AF, a distintas relaciones molares GM ₁ /Ptx	131
Tabla XIII:	Características físico-químicas de micelas de GM ₁ modificadas con AF	133

RESUMEN

Una de las estrategias terapéuticas actuales contra el cáncer está orientada a mejorar la efectividad de los fármacos anticancerígenos existentes mediante el desarrollo de sistemas innovadores de transporte [13,14] que permitan modificar las características farmacocinéticas y de biodistribución de los principios activos. En esta línea, recientemente desarrollamos una nanoestructura micelar compuesta por monosialoglicoesfingolípidos (GM₁) capaces de transportar fármacos hidrofóbicos (Ptx) y anfipáticos (Doxo) con alta eficiencia [80,81].

En este trabajo se planteó modificar estas micelas mediante la incorporación de una molécula de reconocimiento celular, con el objetivo de focalizar la acción citotóxica del fármaco vehiculizado hacia las células tumorales. Se evaluó la incorporación de moléculas de reconocimiento celular como el ácido fólico, anticuerpos, espermidina y lipoproteínas en las micelas de GM₁, se caracterizaron las estructuras resultantes y se determinó la actividad farmacológica de las micelas modificadas.

Algunas de las estructuras obtenidas, como GM₁-espermidina y GM₁-LDL mostraron diferencias significativas respecto a las micelas de GM₁ en la internalización de fármacos frente a líneas tumorales *in vitro*. En el caso de GM₁-IgG, si bien los resultados de actividad biológica *in vitro* de los fármacos vehiculizados no mostraron diferencias respecto al efecto de los mismos fármacos transportados en micelas de GM₁ sin anticuerpos, se demostró que los anticuerpos forman complejos estables con las micelas, mantienen su capacidad de reconocimiento específico y no son desplazados por otras proteínas plasmáticas. Esto permite proponer al complejo GM₁-IgG/fármaco como un sistema mixto, en el cual se puede combinar la acción efectora de los anticuerpos con el efecto biológico de los fármacos.

Finalmente, se demostró que moléculas pequeñas como el ácido Fólico (AF) pueden ser incorporadas en la estructura micelar aplicando diferentes estrategias. En las condiciones evaluadas, las micelas modificadas con AF no revelaron diferencias significativas de actividad respecto a las micelas de GM₁ frente a células tumorales RF positivas.

El conjunto de resultados presentados en este trabajo nos permiten concluir que es posible modificar las micelas de GM₁ con moléculas de reconocimiento

celular de diferente naturaleza, posibilitando el diseño de micelas funcionales con características adecuadas para aplicaciones farmacológicas.

Palabras claves: gangliósidos, micelas, ligandos, funcionalización, direccionamiento activo, terapia del cáncer.

SUMMARY

One of the current therapeutic strategies against cancer aims to improve the effectiveness of existing anticancer drugs through the development of innovative transport systems [13, 14] that allow modify the pharmacokinetics and biodistribution of the active principles. In this subject, we recently developed a micellar nanostructure composed of mono sialoglycosphingolipids (GM₁) capable of transporting hydrophobic (Ptx) and amphipathic (Doxo) drugs with high efficiency [80,81].

In this work, we propose to modify these micelles by the incorporation of a cell recognition molecule, with the aim of focusing the cytotoxic action of the drug to the tumor cells. The incorporation of these molecules, such as folic acid, antibodies, spermidine and lipoproteins into GM₁ micelles was evaluated, the resulting structures were characterized and its pharmacological activity was determined.

Some of the structures such as GM₁-spermidine and GM₁-LDL showed significant differences with respect to GM₁ micelles in the internalization of drugs in tumors cell lines. In the case of GM₁-IgG, although the results of *in vitro* biological activity of the drugs administered did not show differences regard effect we shown of the same drugs transported in GM₁ micelles without antibodies, the antibodies were shown to form stable complexes with the micelles, maintain their specific recognition capacity and are not displaced by other plasma proteins. This allows to propose the GM₁-IgG/drug complex as a mixed system, where combine the activity of the antibodies with the biological effect of the drugs.

Finally, it is shown that small molecules such as folic acid (FA) can be incorporated into the micellar structure by applying different strategies. Under the conditions evaluated, the FA-modified micelles loaded with drugs revealed no significant differences pharmacological with respect to GM₁ micelles versus RF positive tumor cells.

The set of results presented in this work allows us to conclude that it is possible to modify GM₁ micelles with cell recognition molecules of different nature, making possible the design of functional micelles with characteristics suitable for particular uses.

Keywords: gangliosides, micelles, ligands, functionalization, drug targeting, cancer therapy.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Cáncer

El término cáncer hace referencia a un conjunto de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento celular acelerado e incontrolado; resultado de mutaciones, o cambios anómalos, en los genes que regulan el crecimiento de las células y las mantienen sanas [1]. Estos cambios provocan que las células se dividan sin control y sin orden formando una masa de tejido conocido como tumor. Al crecer estos tumores pueden invadir y dañar tejidos y órganos que se encuentran a su alrededor o bien, algunas células pueden desprenderse y moverse a lugares distantes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o linfático y formar nuevos tumores lejos del tumor original, proceso denominado metástasis. Más de 200 tipos de tumores han sido descritos, pudiendo afectar a cualquier parte del cuerpo. Cada uno de estos tiene un origen y características particulares, con una evolución, pronóstico y tratamiento diferente.

A nivel celular, se acepta que el cáncer es un desorden molecular, resultado de cambios genéticos por mutaciones adquiridas a través del tiempo en múltiples genes o en genes claves, que conducen a la transformación progresiva de las células normales a malignas. Durante su transformación, las células tumorales adquieren ciertas características distintivas, independientemente del órgano en el cual se desarrollen, como son la: capacidad de generar sus propias señales de crecimiento; insensibilidad o evasión a señales inhibitorias de crecimiento; evasión de la muerte celular programada (apoptosis); un ilimitado potencial replicativo y la capacidad de invadir tejidos generando metástasis [2]. También se conoce hoy que la mayoría de estas células tumorales tienen capacidad de modificar o reprogramar su metabolismo celular y pueden evadir el sistema inmunológico, con el fin de ayudar la proliferación neoplásica [3].

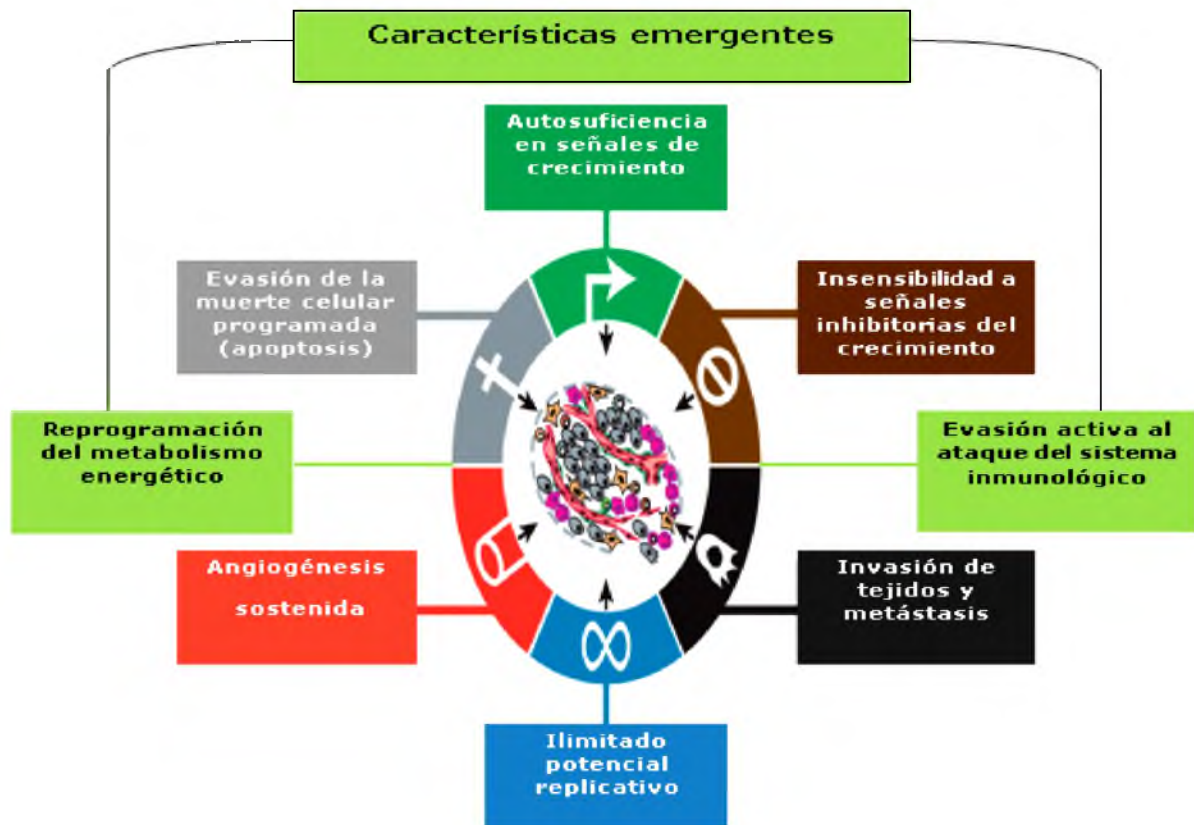


Figura 1: Características distintivas de las células cancerosas. Durante el progreso de transformación las células tumorales adquieren capacidades funcionales. Adaptado de Hanahan, & Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*: 144(5):646-74, 2011. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Las células tumorales no actúan solas, necesitan recibir señales del entorno que las rodea para mantener el fenotipo maligno. El microambiente tumoral juega un papel decisivo al crear y establecer las características de crecimiento, morfología e invasividad de un tumor maligno; influye en las características biológicas de los tumores así como en los procesos de metástasis, angiogénesis, resistencia a fármacos y respuesta inmunológica [3]. El tejido tumoral se caracteriza por tener una fisiología alterada en comparación con los tejidos normales.

Sorprendentemente, a pesar de los importantes avances realizados en los últimos años para entender y contener esta enfermedad, según datos estadísticos, el cáncer sigue siendo una de las causas de muerte más devastadoras a nivel mundial. Sólo en el año 2012, la OMS indicó que causó 8,2 millones de muertes en todo el mundo y casi 62.000 en la Argentina. Además, se prevé que esta tendencia continúe aumentando en todo el mundo y alcance los 13,1 millones para 2030 [4,5]. Esto se debe, principalmente, a la complejidad

de esta enfermedad, lo que hace difícil la aplicación sistemática y eficaz de los tratamientos convencionales, incluso de las nuevas y prometedoras terapias. Y lo que es aún más complejo: el cáncer evoluciona, lo que pone en discusión la búsqueda de una única cura y deja en evidencia que para atacar el cáncer se necesitan múltiples soluciones.

1.2 Tratamientos:

Hay muchos tipos de tratamientos contra el cáncer y dependen de un gran número de factores que incluyen el tipo, la localización y la extensión de la enfermedad, así como del estado de salud del paciente. Los más comunes son la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. Opciones más recientes incluyen la terapia dirigida, la inmunoterapia y la terapia hormonal, entre otras. Cada una de estas modalidades tiene sus ventajas y desventajas y generalmente es necesaria una combinación de ellas para producir resultados más eficaces.

De todos ellos, la quimioterapia citostática o tradicional sigue teniendo un papel fundamental en el tratamiento del cáncer. Es el tratamiento que se realiza con un fármaco o una combinación de fármacos denominados antineoplásicos que actúan interfiriendo en las diferentes fases del ciclo celular, con el objeto de conseguir la muerte, bloquear, o hacer más lento el crecimiento de las células cancerosas. Cuanto más rápido se dividen las células, más sensibles son a este tipo de tratamiento. Precisamente, debido a que las células cancerosas en general crecen y se dividen a gran velocidad, la quimioterapia las destruye más rápido que a la mayoría de las células normales. No obstante, esta modalidad de tratamiento tiene una gran limitación: la mayoría de los fármacos utilizados no son específicos contra células cancerígenas. También pueden destruir o hacer lento el crecimiento de células sanas, especialmente aquellas que se multiplican a gran velocidad como las del tubo digestivo, de los folículos pilosos, la boca, uñas o de la médula ósea, provocando efectos secundarios sistémicos muy variados, y en ocasiones graves. Esto disminuye notablemente la calidad de vida de los pacientes. Además, otros obstáculos condicionan la eficacia de este tipo de tratamiento como ser: a) limitaciones en las propiedades de los fármacos (baja solubilidad, baja biodisponibilidad, rápida eliminación, dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica), b) la presencia de anomalías en la arquitectura vascular y la falta de vasos linfáticos que entorpecen la llegada del compuesto a

la región central y c) mecanismos de resistencia a múltiples fármacos desarrollado por las células tumorales. Esta problemática ha dado lugar a la ciencia a la búsqueda y desarrollo de nuevas terapias anticancerígenas en base a fármacos.

En la actualidad, la investigación terapéutica contra el cáncer se aborda desde dos estrategias diferentes; ambas orientadas a conseguir una mayor actividad biológica y una mejor especificidad en la acción. Una estrategia se concentra en la búsqueda de moléculas biológicamente activas, dirigidas a dianas moleculares específicas del tumor. Las moléculas en investigación apuntan a interferir sobre cada una de las capacidades adquiridas mencionadas anteriormente (fig. 1). Esta línea se está llevando a cabo principalmente, mediante el cribado ("screening") de productos naturales, síntesis de compuestos de bajo peso molecular vía química tradicional [6] o bien, a partir de la identificación de macromoléculas naturales, incluyendo anticuerpos [7], proteínas y oligonucleótidos [8-11] con inherente actividad biológica. Sólo unos pocos han sido aprobados hasta el momento, tales como Imanitib mesylate (comercializado como Gleevec®), Gefitinib (Iressa®), Trastuzumab (Herceptin®) y Cetuximab (Erbix®). El limitado progreso conseguido siguiendo esta estrategia se atribuye principalmente al uso de modelos preclínicos poco predictivos, la enorme inversión que significa la conversión de potenciales agentes terapéuticos en fármacos y en muchos casos, por obstáculos similares a los fármacos convencionales, como mala solubilidad en agua, limitaciones de la farmacocinética y efectos adversos secundarios. Cada año aproximadamente 20000 nuevas sustancias son "descubiertas" o "producidas". De estas, sólo 50 aprueban los requisitos preclínicos y pasan a su aplicación en seres humanos, y finalmente son solo dos o tres, las que verdaderamente son eficaces y aparecen como nuevos medicamentos en el mercado (fig. 2)[12].

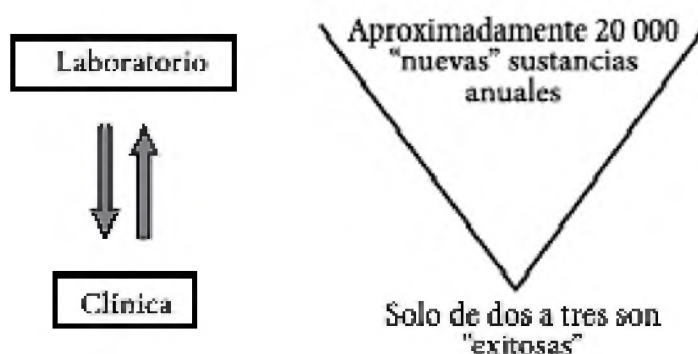


Figura 2: Investigación terapéutica de nuevos fármacos.

El segundo enfoque está orientado a mejorar la efectividad de los agentes anticancerígenos existentes, mediante el desarrollo de sistemas innovadores de transporte [13,14], que permitan modificar las características farmacocinéticas y de biodistribución de los principios activos. Estos sistemas pretenden aumentar la acumulación específica del fármaco en el tejido tumoral e incrementar el tiempo de exposición fármaco-célula maligna, reduciendo a la vez la exposición de los tejidos normales a la misma. Esta estrategia de bajo riesgo/alta rentabilidad centra el problema en mejorar las propiedades del fármaco, ya que los riesgos inherentes a su utilización son conocidos.

1.3 Nanotransportadores

La introducción de la Nanotecnología dentro del campo de la Biotecnología y la Medicina [15,16] ha permitido un enorme avance en solucionar viejos problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos de los fármacos de uso tradicional, incluidos los citostáticos. Es la base, entre otras cosas, del desarrollo de nanosistemas transportadores de fármacos (vectorización) con beneficios potenciales para el paciente y nuevos mercados para la industria. Este concepto no es completamente nuevo, sin embargo ha sido en los últimos años cuando se han producido las innovaciones y aplicaciones terapéuticas más interesantes.

Se entiende por nanosistemas de transporte de fármacos, o simplemente nanotransportadores terapéuticos, a aquéllos sistemas farmacéuticos diseñados químicamente que presentan un tamaño nanométrico (de 1 a cientos de nanómetros) capaces de incluir un principio activo, ya sea disuelto o dentro de una matriz, atrapado en el interior, encapsulado, o adsorbido en su estructura y transportarlo de manera segura en el cuerpo hasta su objetivo terapéutico, sin modificarle su actividad biológica. A partir de la incorporación, la farmacocinética, biodistribución y tráfico intracelular del principio activo se independiza de su estructura química y pasa a depender de la naturaleza estructural del nanotransportador.

Para cumplir su objetivo, es necesario que el nanotransportador: a) sea biocompatible y biodegradable; b) tenga un tamaño nanométrico (nm), preferentemente menor a 200nm para evitar ser capturados por el sistema retículo endotelial (SRE) pero, a la vez, que sean mayores a 10nm, con un peso

molecular mayor de 40kDa para evitar ser eliminados por filtración renal; c) posea alta capacidad de incorporar principios activos, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos; d) pueda permanecer en el torrente sanguíneo por tiempos prolongados y que, e) se puedan acumular inespecíficamente o específicamente en los sitios requeridos del organismo. Además, deberían ser susceptibles de producirse a escala industrial. Las estructuras mayores de 200 nm no son muy utilizadas debido a que pueden activar el sistema inmunológico y ser eliminadas de la sangre por las células Kupffer.

Hasta la fecha, son numerosos los sistemas diseñados cuya característica común es el tamaño en escala nanométrica, a partir de una variedad de materiales que incluyen, polímeros (nanopartículas, micelas, conjugados o dendrímeros), lípidos (microemulsiones, liposomas, micelas), virus (nanopartículas virales), ciclodextrinas o compuestos organometálicos (nanopartículas de sílica, de oro, nanotubos) (fig. 3) [13,14]). Desde simples sistemas, como fármacos encapsulados en liposomas a otros más complejos, conocidos como nanoplataformas multifuncionales, que no solo contienen el principio activo sino también otros elementos que permiten la orientación hacia objetivos terapéuticos específicos, visualización del fármaco y seguimiento de su actividad.

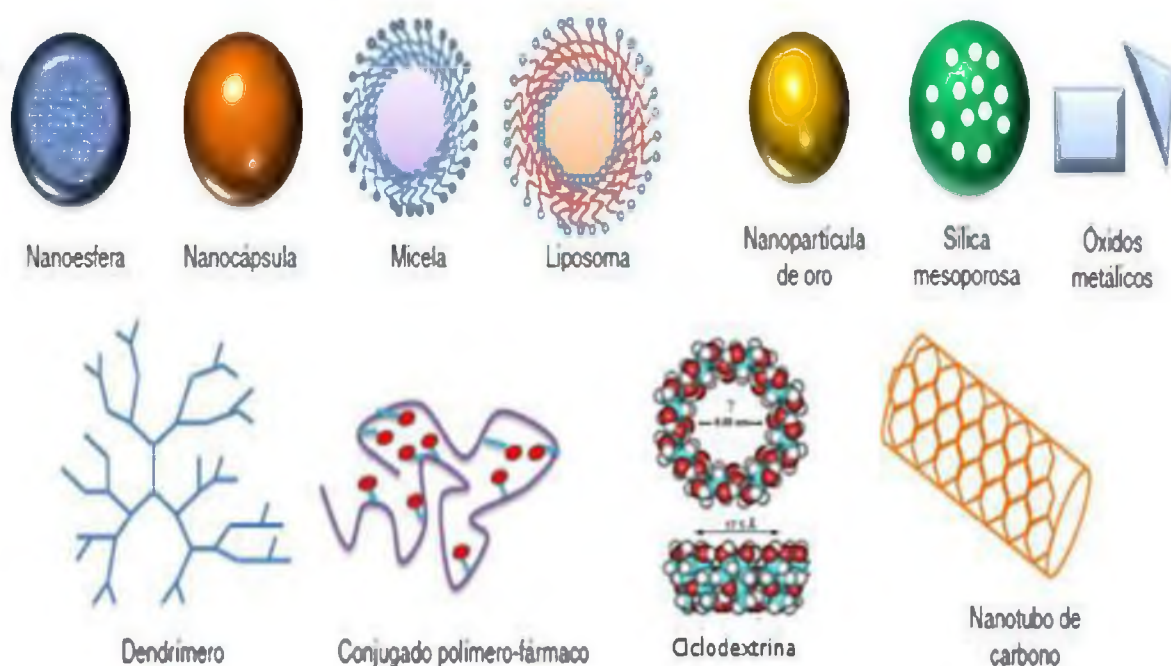


Figura 3: Representación de nanotransportadores diseñados para el transporte y liberación de fármacos.

Estructuras de idénticas dimensiones pueden presentar distintas propiedades de acuerdo al material con que se las prepare. En la tabla 1 se destacan las principales ventajas y desventajas del uso de los nanotransportadores mencionados.

Tabla I: Ventajas y desventajas de los principales sistemas nanotransportadores de fármacos

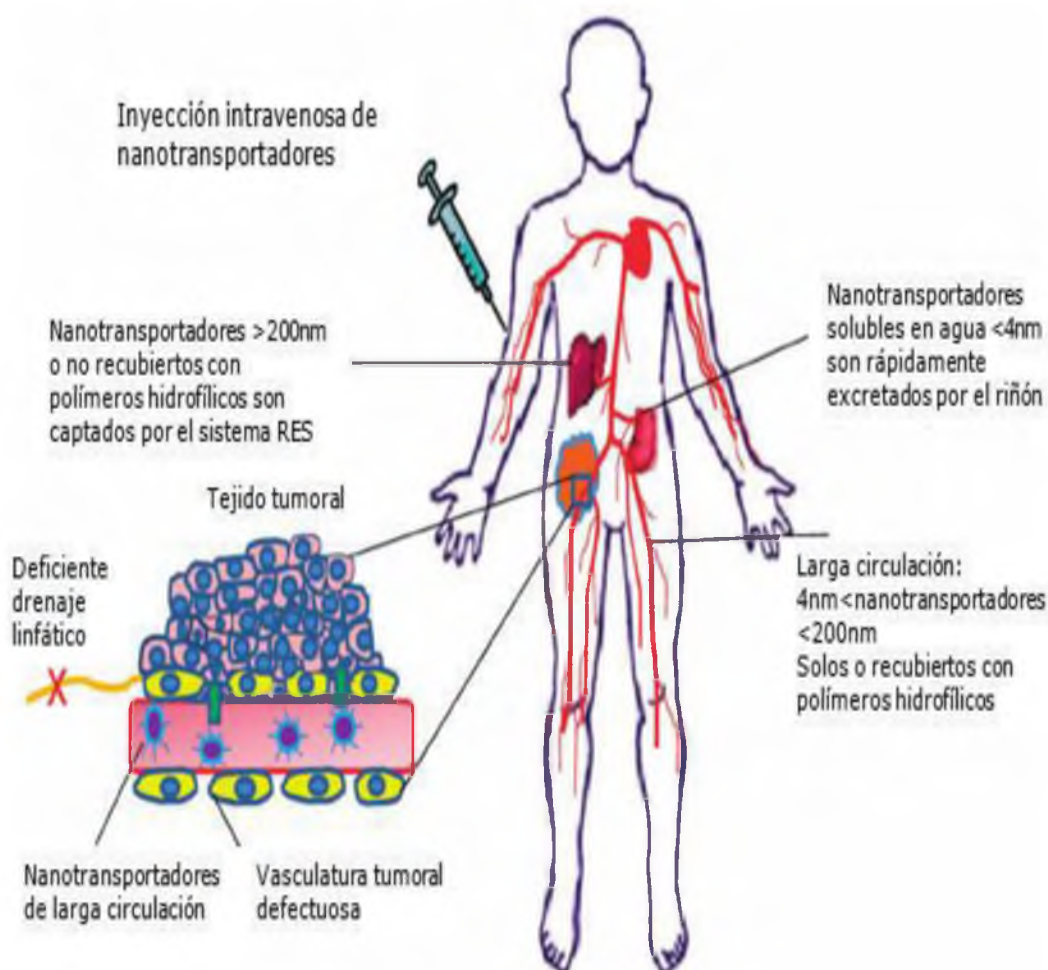
SISTEMA	ESTRUCTURA	VENTAJAS	DESVENTAJAS	EJEMPLOS
LIPOSOMAS	Vesículas Bicapa de fosfolípidos con núcleo acuoso	-Biocompatibles -Biodegradables -Baja toxicidad -Incorporan PA de distinta polaridad -Versátiles -Funcionalización de su superficie	-Baja estabilidad -Fusión inespecífica con membranas -Elaboración compleja y costosa -Opsonización RES -Requiere liofilización	DOXIL MYOCET
CONJUGADOS Polímero-Fármaco	Polímero lineal con unión covalente al PA	-Biodegradables -Acumulación pasiva	-Biodistribución impredecible -Toxicidad	XYOTAX (PGA-Ptx)
NANO PARTÍCULAS	Matriz polimérica Cubierta polimérica	-Biocompatibles -Protección del fármaco -Liberación controlada -Carga de moléculas de distinta polaridad -Funcionalización de su superficie -Degradación controlable	-Baja capacidad de carga de PA -Requiere liofilización -Agregación -Producción engorrosa y costosa	ABRAXANE Albúmina-Ptx
DENDRÍMEROS	Polímero sintético Monómeros hiper- ramificados emergiendo radialmente del centro	-Estables -Baja polidispersidad -Funcionalización de su superficie -Homogeneidad química y estructural	-Tóxicos, lisis de membranas celulares por la carga (+) -Rápida liberación del fármaco -Reducida biocompatibilidad	PANAM-MTX [17]

NANOTUBOS DE CARBONO	Cilindro hueco cerrado o abierto	-Terapia génica -Multifuncionales -Multivalentes	-Toxicidad -Escasa biocompatibilidad -Insolubles	NTC-MTX [18]
CICLO-DEXTRINAS	Moléculas de azúcar unidas en forma de anillo (oligosacáridos cíclicos). Cavity para transportar moléculas	-Solubilización de fármacos -Estabilidad física y química -Protección del fármaco	-Carga de moléculas sólo hidrofóbicas y de tamaño compatible con la cavity	[19]
PARTICULAS VIRALES	Estructura de proteínas de cápside viral	-Autoensamblables -Variedad morfológica -Funcionalizables. -Multivalentes -Geometría definida	-Riesgo de respuesta inmune -Capacidad de carga	HSP-DOX [20]
MICELAS	Polímeros o lípidos anfipáticos Estructura de núcleo hidrofóbico rodeado de una cubierta hidrofílica	-Biocompatibles -Formación espontánea -Funcionalizables -Incorporan PA de distinta polaridad -Versátiles	-Baja estabilidad en solución por fenómenos de dilución -Polidispersión de tamaño	GENEXOL PLA/PEG-Ptx

Con varios de estos sistemas se ha podido alcanzar diferentes objetivos, como: 1) solubilizar compuestos altamente lipofílicos, haciéndolos biodisponibles; 2) proteger al fármaco de su degradación, tanto física como química; 3) modificar las características farmacocinéticas de los fármacos; 4) evitar que el fármaco interaccione precozmente con el entorno biológico, reduciendo la toxicidad; 5) cargar una gran cantidad de fármaco, reduciendo las dosis. De todos ellos, los liposomas, micelas y nanopartículas son los más estudiados y que han conseguido los principales avances clínicos hasta el momento. No sólo han demostrado tener las características más adecuadas para la encapsulación de fármacos, genes y agentes de contraste, superando con facilidad a sistemas de administración de fármacos convencionales, sino que además, demostraron capacidad para alcanzar otros fines como: 1) transportar las nuevas moléculas biotecnológicas, obtenidas a partir del método de cribado de productos naturales o la síntesis de compuestos, que en general, son insolubles en medio acuoso; 2) proteger al fármaco del reconocimiento de sistemas de resistencia a fármacos como la P-glicoproteína, que se sobreexpresa frecuentemente en células

cancerosas y es una de las principales fuentes de la resistencia a múltiples fármacos (MDR, sigla en inglés)[21-23]; 3) combinar más de un fármaco o terapia en un único sistema. Idea que se ha extendido más allá de combinar dos fármacos antineoplásicos, sino la posibilidad de combinar agentes farmacológicos totalmente diferentes -por ejemplo, combinaciones de agentes quimioterapéuticos con inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de proteasa, inmunoterapia, terapias hormonales y moduladores de la resistencia a múltiples fármacos [24,25]; 4) construir sistemas o nanoplateformas multifuncionales para diagnosticar y tratar un proceso tumoral simultáneamente (sistema teranóstico) [26-28]; 5) transportar una nueva clase de fármacos denominados "biológicos", los cuales incluyen anticuerpos, proteínas, péptidos y material genético [29-33] y 6) funcionalizar su superficie con polímeros que optimizan su farmacocinética [34] o moléculas que reconocen selectivamente a la célula cancerígena (transferrina, ácido fólico, péptidos, anticuerpos) [35-37].

En general, por el tamaño nanométrico y ciertas propiedades de superficie como la carga neta, la hidrofiliidad y morfología, los nanotransportadores adquieren un perfil de biodistribución diferente en el organismo, en comparación a las formas convencionales de dosificación de fármacos. Estos nanosistemas no pueden difundir a través del endotelio vascular/capa de músculo liso /membrana basal, ni penetrar los poros de la vasculatura (<6 nm en vénulas post capilares), por lo tanto evitan la mayoría de los tejidos normales, en comparación con la inyección intravenosa sistémica de fármacos que comúnmente penetran en los tejidos. En cambio, pueden pasar a través de vasos sanguíneos en sitios patológicos que presentan fallas en la vasculatura debido a la condición patológica, permitiendo una acumulación en el sitio (acumulación pasiva) (fig. 4). Este fenómeno conocido como efecto de la permeabilidad y retención aumentada (Enhanced Permeability and Retention, siglas en inglés) o efecto EPR [38-40] está presente en la mayoría de los tumores sólidos (que constituyen cerca del 85% de los cánceres humanos) así como algunos nódulos tumorales metastásicos vascularizados, y representa el principal mecanismo con el cual los nanotransportadores han demostrado aumentar consistentemente la fracción de la dosis de fármaco inyectado que llega y se acumula en el tejido tumoral, reduciendo los efectos secundarios asociados con los tratamientos convencionales.



Acumulación en el tumor por el efecto EPR

Figura 4: Ilustración esquemática de la biodistribución selectiva de los nanotransportadores inyectados por vía intravenosa mostrando la acumulación en tumores debido al efecto EPR, absorción por el sistema SRE y excreción por el riñón. Adaptado de (103)

Este efecto, descrito inicialmente por Maeda y colaboradores [41], se basa en la mayor permeabilidad de los capilares sanguíneos que irrigan el tumor por defectos asociados con una formación defectuosa. Las células endoteliales están desorganizadas, frecuentemente separadas por espacios de entre 200 y 600 nm, permitiendo el paso por simple convección o difusión pasiva de macromoléculas de elevado peso molecular (40kD o más) o nanoestructuras y su acumulación en el espacio intersticial. La combinación de la vasculatura anómala, asociada a un deficiente drenaje linfático presente en el microambiente tumoral da lugar a la acumulación de las nanoestructuras durante más tiempo que en los tejidos normales (fig. 5).



Figura 5. Diferencias entre los tejidos normales y los tumorales que explican la acumulación pasiva de los nanotransportadores debido al efecto EPR. Adaptado de (52)

Claramente, la arquitectura vascular es la responsable directa de la biodistribución selectiva de los nanosistemas terapéuticos inyectados endovenosamente (fig. 6).

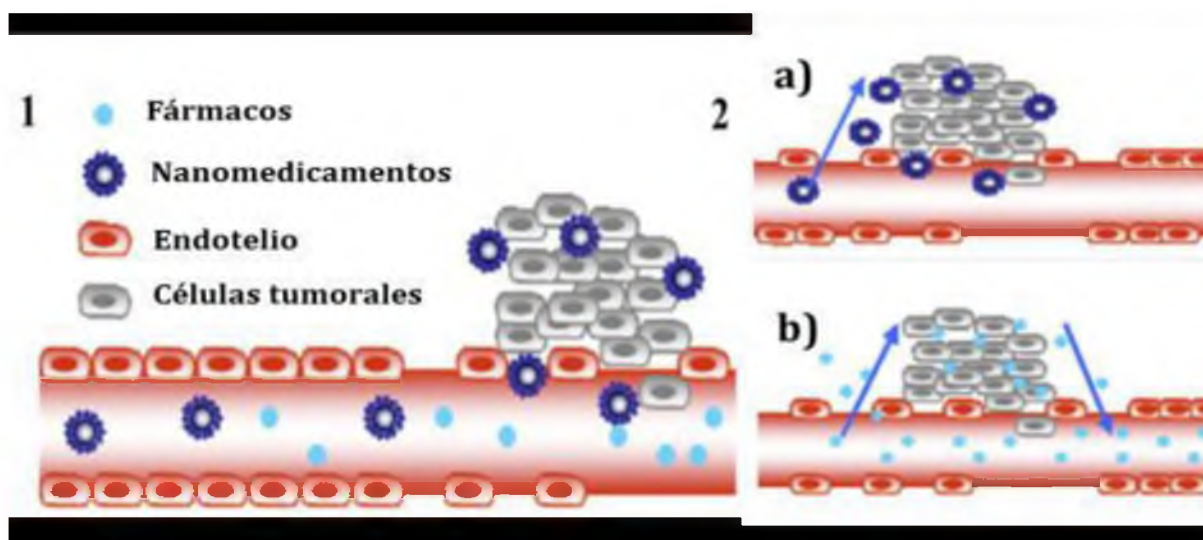


Figura 6: Acumulación pasiva. Representación esquemática del mecanismo de biodistribución selectiva por el efecto de permeabilidad y retención aumentada. En éste tipo de biodistribución selectiva los nanomedicamentos (nanotransportador con fármaco asociado) y también los fármacos atraviesan el endotelio de los vasos sanguíneos que irrigan el tumor debido a la existencia de grandes espacios en los mismos (1), los nanomedicamentos son retenidos debido a la pobre irrigación linfática (2a), mientras que los fármacos vuelven a la circulación (2b), (Extraído de 42)

Ejemplos de nanosistemas terapéuticos que se acumulan pasivamente aprobados para uso clínico [43] son el Doxil (Caelyx en Europa; liposomas PEGilados cargado con doxorubicina), DaunoXome (liposomas no PEGilados cargado con daunorrubicina), DepoCyt (liposomas PEGilados cargados con citarabina), Myocet (liposomas no PEGilados cargados con Doxo), Oncaspar (conjugados polímero-proteína L-asparaginasa pegilada), Abraxane (nanopartículas de albúmina cargadas con paclitaxel), y Genexol-PM (micelas poliméricas cargadas con paclitaxel, aprobado en Corea). El Doxil® es un nanosistema basado en liposomas PEGilados cargados con Doxo, aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer de ovario como se mencionó anteriormente. A pesar de las limitaciones que presenta, mejora la biodistribución de la Doxo en los tejidos tumorales por el efecto EPR. También hay vacunas que usan liposomas, como la diseñada para el cáncer de pulmón de células no pequeñas, que ataca un péptido de la mucina 1 y se la asoció con la mejoría en la función inmune contra este tumor. El Abraxane® es una nanopartícula de albúmina cargada de Ptx. Reduce los efectos secundarios asociados al Cremophor-EL (solvente utilizado en otras formulaciones), tales como reacciones de hipersensibilidad anafiláctica grave, hiperlipidemias, patrones anormales de lipoproteínas, la agregación de eritrocitos, y neuropatía periférica [44]. Por otra parte, algunos estudios han demostrado que la albúmina también juega un papel agonista en la efectividad del paclitaxel, debido a su interacción con dos proteínas en circulación sanguínea. Una de las proteínas es la gp60, localizada en la superficie del endotelio vascular, la cual facilita la acumulación de las nanopartículas en el fluido intersticial del tumor [45]. La segunda es la osteonectina o SPARC (siglas en inglés de proteína secretada, ácida y rica en cisteína) que se encuentra en la superficie de una gran variedad de células tumorales e interacciona con la albúmina provocando la acumulación de las nanopartículas en las células tumorales [46]. Abraxis Bioscience ha empleado esta misma tecnología para la formulación de nanopartículas de albúmina con el fármaco citostático docetaxel (ABI-008) y con el antibiótico rapamicina (ABI-009), que se encuentran actualmente en fase clínica II y I, respectivamente [47].

Varios nanomedicamentos más direccionado pasivamente al tumor se encuentran actualmente en ensayos clínicos [48], y muchos otros en fase preclínica temprana o avanzada [48,49].

El establecimiento de este principio y la comprensión de los factores que controlan el efecto EPR aceleraron el desarrollo de numerosos nanotransportadores, así como de estrategias orientadas a mejorar el efecto EPR o atenuar las características anti-EPR. Diversos estudios señalan que la acumulación pasiva de los nanosistemas por el efecto EPR puede potenciarse mediante la coadministración de una diversidad de factores que tienen acción sobre la vasculatura. Agentes vasculares que generan óxido nítrico (nitroglicerina o ISDN (dinitrato de isosorbida), antagonistas basados en VEGF, TNF- α y potenciadores de la bradiquinina, es decir, inhibidores de la ECA que disminuyen la presión sanguínea, afectan el EPR y son relativamente seguros, económicos y eficaces [50-52]. No obstante, se requieren estudios adicionales para validar los beneficios de tales agentes en el contexto clínico. También la retención del nanotransportador en el tejido tumoral puede ser aumentada ajustando su tamaño y sus características superficiales como la hidrofilia y la carga. Cualquier vehículo transportador debe tener una superficie lo más hidrófila posible para retardar su identificación por el SRE, mediante procesos de opsonización [adsorción superficial de opsoninas (un tipo de proteínas plasmáticas)] y captura por los macrófagos. Esto puede lograrse: i) recubriendo la superficie con un polímero hidrófilo (p.ej., polietilenglicol, PEG) como el Doxil; o, alternatively, ii) el sistema transportador puede estar constituido por copolímeros con dominios hidrófilos e hidrófobos. Todo eso posibilita un notable aumento en el tiempo de residencia del sistema en el organismo (mayor semivida plasmática) y, así, dirigir el fármaco directamente a los tumores localizados fuera de las regiones del SRE.

Si bien las estrategias de transporte o acumulación pasiva contribuyen efectivamente al logro de una mejor localización y acumulación de fármacos en el lugar de acción, este principio no se aplica por igual a todos los tumores sólidos, haciendo que los nanosistemas sean ampliamente útiles para el transporte de fármacos contra el cáncer. Las tasas de respuesta son muy variables, probablemente relacionadas con la amplia heterogeneidad del efecto EPR observados entre los tipos de tumores y dentro de tumores individuales. Se ha observado que dentro de un mismo tumor hay grandes diferencias en la permeabilidad vascular. En algunos casos, los nanomedicamentos sólo pueden acercarse a las células de una limitada fracción del volumen tumoral. En general, el EPR varía con el tipo de tumor, la ubicación anatómica y posiblemente por

factores que intervienen en la composición de la matriz extracelular y/o estructura del tumor [50-52]. Por otra parte, la realidad muestra que aun existiendo el efecto EPR, el hígado (ampliamente fenestrado) colecta la mayoría de los nanosistemas inyectados endovenosamente y son absorbidos por células del sistema SRE, debido generalmente a propiedades físico-químicas inadecuadas del nanotransportador.

Nuevas alternativas que vayan más allá de la optimización del tamaño, el recubrimiento y la carga constituyen actualmente un objetivo importante para lograr aumentar el nivel de acumulación de los fármacos dentro del tejido patológico y así conseguir mayor aplicabilidad clínica de estos nanosistemas terapéuticos. En este sentido, la funcionalización o modificación superficial de los nanotransportadores ha impulsado una nueva ola de innovación para conseguir una mayor captación y especificidad de los fármacos a nivel tisular, celular y subcelular (fig. 7).

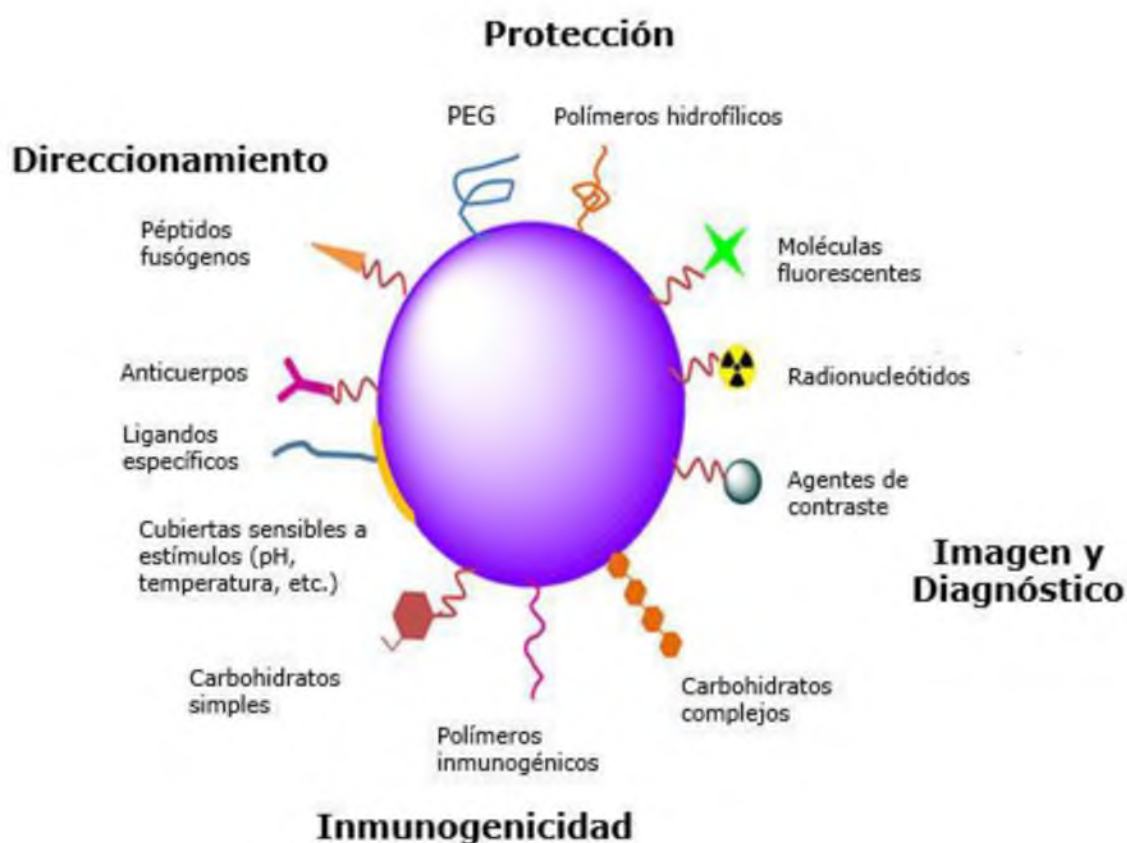


Figura 7: Ejemplos de funcionalización de nanotransportadores. Los nanotransportadores pueden ser funcionalizados de manera diferente para alcanzar distintos objetivos. Adaptado de (104)

Hoy en día hay reportadas innumerables modificaciones de la superficie de una gran variedad de nanotransportadores, con resultados bastante prometedores en cuanto a conferirles diferentes funciones [53,54], tales como:

a) prolongar el tiempo de permanencia en sangre del nanosistema para mejorar la acumulación pasiva (por ejemplo: recubrimientos con PEG de bajo peso molecular (2.000 a 5.000 kDa) u otro polímero); b) posibilitar la liberación del fármaco en función de determinadas características como pH y temperatura; c) mejorar la penetración al interior celular por medio de los llamados péptidos fusogénicos; d) mejorar la internalización celular modificando la carga superficial de los nanosistemas, mediante incorporación de carga de superficie catiónica, u otras estrategias; e) funcionalizar el diagnóstico y control externo (nanotransportadores modificados mediante la inclusión de partículas metálicas magnéticas [55-57] y moléculas fluorescentes [58] que permiten el seguimiento y control (en el caso de las partículas magnéticas) de la biodistribución del nanotransportador, además de un diagnóstico de las enfermedades; y f) posibilitar el reconocimiento específico y unión a tejidos o células diana mediante ligandos específicos como anticuerpos monoclonales, aptámeros, fragmentos F_{ab} , ácido fólico o transferrina, etc.

La funcionalización con ligandos constituye hoy en día una de las alternativas más desarrolladas [59-61], buscando establecerse como una parte mandataria del proceso de diseño y producción de los nanotransportadores debido a la gran especificidad que provee a estos

1.4 Nanotransportadores funcionalizados con ligandos

Gracias a los rápidos avances en nanotecnología y biología celular, numerosos estudios señalan que el transporte pasivo de los nanomedicamentos puede mejorarse mediante la incorporación superficial de ligandos de receptores o antígenos expresados selectivamente por las células blanco, aumentando de este modo la especificidad del tratamiento [59-61]; estrategia conocida como direccionamiento o transporte activo de fármacos (active targeting, en inglés). La hipótesis de este enfoque es que las interacciones específicas entre el ligando del nanotransportador y el tumor deben resultar en una mejor acumulación y retención en tumores y, por lo tanto, en un efecto terapéutico mejorado.

Esta estrategia hace referencia a una retención activa del nanosistema y no sólo una simple acumulación por convección y difusión en los tejidos tumorales, caracterizada por una marcada especificidad hacia las células tumorales. La especificidad se la puede conseguir a través de procesos de reconocimiento

molecular, principalmente, uniones ligando-receptor o interacciones antígeno-anticuerpo, lo que generalmente conduce a la internalización del nanosistema en la célula tumoral. Aprovecha la sobreexpresión o expresión diferenciada de varios tipos de receptores en la superficie de las células tumorales (fig. 8). De forma alternativa, este tipo de estrategias también se basan en el diseño de nanosistemas con capacidad para responder a estímulos sitio-específicos. Los estímulos a los que son sensibles se pueden producir en el interior del organismo (p.ej., cambios de pH, temperatura, calor, sistemas enzimáticos), o bien pueden tener un origen externo (p.ej., campos magnéticos, luz, ultrasonido). Esta alternativa permite regular la duración e intensidad del efecto farmacológico. Ejemplo de ello es el Thermodox®, liposomas PEGilados termo-sensibles que liberan Doxo luego de incrementar su permeabilidad en respuesta a estímulos locales [62].

En ambos casos, el sistema transportador se acumulará totalmente en la región deseada y solo allí liberará el fármaco antitumoral.

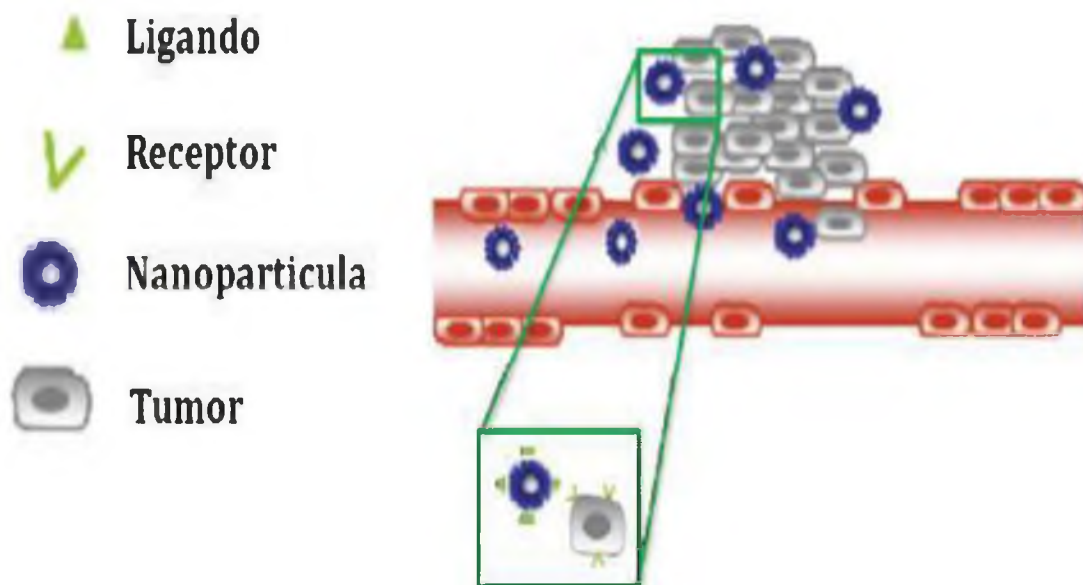


Figura 8. Biodistribución activa. Representación esquemática del mecanismo de transporte activo, mediante el cual el nanomedicamento puede liberar el fármaco selectivamente en el tejido tumoral. La figura muestra la funcionalización del nanomedicamento con ligandos específicos a receptores sobreexpresados en las células tumorales (Adaptado de (42))

Todos los nanotransportadores mencionados anteriormente pueden ser modificados activamente utilizando ligandos específicos, fijando moléculas o decorando la superficie mediante métodos covalentes y no covalentes [63-66].

La conjugación química covalente proporciona un enlace estable entre el ligando y el transportador. Esta puede realizarse antes o después de la formación del nanotransportador y los métodos incluyen diferentes reacciones químicas tales como unión amida (por ejemplo, el método de carbodiimida), unión tioéter, sulfhídrico o dobles enlaces, el intercambio de disulfuro, entre otras [64,65]. Utiliza una serie de compuestos químicos para modificar o unirse al grupo reactivo disponible en el transportador y ligando. Otros compuestos funcionan como espaciadores, extendiendo el ligando desde la superficie de la nanoestructura. Las reacciones deben seleccionarse de forma adecuada para evitar perjudicar la funcionalidad del ligando reduciendo su capacidad para unirse a su objetivo. La funcionalización covalente puede ser costosa y consumir tiempo porque la química necesita ser optimizada para cada combinación nanotransportador-ligando y debe modificarse en base a las propiedades del fármaco encapsulado. Del mismo modo, diferentes estrategias de unión no covalente basadas en la afinidad estreptavidina-biotina y en la adsorción física del ligando también se usan frecuentemente. La adsorción pasiva es el método más común para unir proteínas a microesferas hidrofóbicas. Se basa principalmente en atracciones hidrofóbicas (Van der Waals, dipolo-dipolo) entre las porciones hidrofóbicas de los ligandos adsorbidos y la superficie de las microesferas. Es el método de unión para la mayoría de los ligandos hidrofóbicos, incluidas las inmunoglobulinas. En general, estas son menos complejas y costosas pero requieren de mayores controles debido a que las interacciones que se establecen entre el ligando y el nanotransportador son menos estables. Los ligandos adsorbidos pueden ser desplazados por moléculas competidoras, tales como proteínas o tensioactivos.

El transporte activo puede conseguirse a diferentes niveles dependiendo del grado de penetración; puede ocurrir a nivel de órgano, célula o subcelular. Es importante señalar que los procesos de transporte activo en los tumores siempre comienzan con la acumulación pasiva en el tejido tumoral, por lo que cualquier nanotransportador dirigido de forma activa debe satisfacer los requisitos básicos mencionados para los sistemas de acumulación pasiva: ser biocompatible, estable en circulación y de un tamaño que permita una extravasación eficiente y la acumulación en tumores.

Todas las estrategias diseñadas están relacionadas específicamente con características bioquímicas y fisiológicas particulares del tumor y con la

sobreexpresión de receptores, condiciones del medio tumoral, etc. Las moléculas utilizadas como ligandos pueden incluir desde simples moléculas de bajo peso molecular a las más complejas macromoléculas, siempre y cuando sean capaces de reconocer y unirse específicamente a moléculas expresadas en las células diana (célula tumoral o del microambiente tumoral). Las propiedades fisicoquímicas del ligando como del nanotransportador modificado afectan a su perfil de circulación sanguínea, su biodistribución y su capacidad para ser internalizados por las células cancerosas [67].

El ejemplo más frecuente de moléculas de bajo peso molecular es el ácido fólico (AF), sustrato principal del receptor de folatos (RF), cuya expresión o sobreexpresión se da en ciertos tipos de tumores como el de ovario, de endometrio, colorectal y los de pulmón. Además, generalmente está ausente en la mayoría de los tejidos humanos normales, con la excepción de unos pocos [68]. Esta molécula también ha sido propuesta para mejorar la eficiencia de formulaciones preparadas como herramientas para el diagnóstico del cáncer, o para mejorar la eficacia de la fototerapia en el tratamiento del cáncer [61,69]. Diversos estudios demuestran que nanosistemas con restos de folato localizados a nivel superficial logran aumentar la acumulación del fármaco antitumoral vehiculado en el interior de las células tumorales y, así, su citotoxicidad [70].

Otro ejemplo es el Ácido Hialurónico (AH), una macromolécula polisacárida sustrato principal del receptor CD44, sobreexpresados en una gran variedad de tumores, como en el ovárico, de estómago, de colon y varios tipos de leucemias [71]. Además de brindar propiedades de "targeting", el AH aporta propiedades de protección a los sistemas en que se ha empleado, lo cual lo convierte en una interesante herramienta para conseguir los dos tipos de direccionamiento en un mismo sistema.

Otros receptores expresados en forma diferenciada en células tumorales son el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR, siglas en inglés) sobreexpresado en células cancerosas en procesos de angiogénesis, los receptores de transferrina, de tirosina-quinasa, del factor de crecimiento epidérmico humano. Además, receptores de reciente descubrimiento como el HER-2, el receptor para la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) y los receptores de guanilil ciclase C, solo por mencionar algunos. El acceso a estos receptores puede conseguirse mediante la funcionalización con los sustratos específicos.

Otra clase de moléculas ampliamente difundidas son los anticuerpos monoclonales [72,73]. Estos son diseñados para su interacción específica contra antígenos y receptores de las células cancerosas. Actualmente, el uso de anticuerpos como ligando se centra en algunos blancos como las integrinas, annexinas, nucleolinas, VEGF, fosfatidilserinas, distintos receptores, etc [74]. Recientemente, se ha propuesto el diseño de nanopartículas modificadas con el anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico-2 (HER-2), el cual está sobreexpresado en varias células tumorales [75,76]. Del mismo modo, nanopartículas de PLGA modificadas superficialmente con el anticuerpo monoclonal citoqueratina, para el transporte activo de cistina (un potente inhibidor de las proteasas extracelulares), han permitido mejorar el tratamiento del cáncer de mama invasivo metastásico.

También se utilizan péptidos para mejorar la internalización celular de fármacos antineoplásicos, como péptidos penetradores de células, dominios de proteínas de transducción, oligoarginina y TAT. La existencia de la secuencia RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) en determinados péptidos y macromoléculas peptidomiméticas, permite que estas biomoléculas tengan una alta afinidad por las integrinas que se encuentran sobreexpresadas en la neovasculatura tumoral [77,78]. El direccionamiento activo a las células endoteliales angiogénicas puede reducir el suministro de sangre a los tumores, privando a las células tumorales de oxígeno y nutrientes en los tumores sólidos.

Los aptámeros son secuencias de ácidos nucleicos de cadena simple (ssDNA y RNA), capaces de unirse de manera estable y muy específica a sus dianas, algunas de las cuales se localizan en la superficie de las células tumorales [60]. Por ejemplo, se ha descrito que el docetaxel mejoró su actividad anticancerígena cuando fue incorporado en nanopartículas de PLGA modificadas a nivel superficial con cadenas de PEG y con el aptámero A10 2'-fluoropiridina (específico del antígeno PSMA que sobreexpresan las células de cáncer de próstata) [79].

Es importante remarcar que los ligandos no dirigen a los nanosistemas a tejidos específicos, sino que aumentan la retención y la captación en los tejidos diana una vez que llegan allí a través de la acumulación pasiva.

Hasta la fecha, numerosas estrategias de direccionamiento activo se encuentran avanzadas a nivel preclínico, sin embargo, sólo nanomedicamentos basados en anticuerpos han sido aprobados para utilizar en clínica, como ser el

Zevalin® (Ibritumomab tiuxetan dirigido a CD20), Bexxar® (Iodine-131 tositumomab dirigido a CD20), Ontak® (se elabora combinando una parte de la IL-2 con una toxina bacteriana de difteria dirigido a CD25) y Mylotarg® (Gemtuzumab ozogamicin dirigido a CD33) se han utilizado con éxito para linfoma no Hodgkin, linfoma de células T y leucemia mieloide aguda.

Todavía no hay ejemplos de aplicación clínica de nanotransportadores modificados con ligandos. Aunque son varias las cuestiones que aún deben resolverse, la nanomedicina sigue avanzando a pasos agigantados y se vislumbra como una de las áreas más prometedoras para el tratamiento de distintas enfermedades, especialmente del cáncer. En este aspecto, el transporte activo es otra herramienta que podría modificar el paradigma de la lucha contra esta enfermedad. Los nanotransportadores funcionalizados están mostrando cada vez más su potencial y pueden servir como un componente esencial en el futuro diseño de nanomedicamentos macromoleculares. Inclusive, podrían mostrar beneficios adicionales ayudando a que los principios activos atravesasen barreras fisiológicas complejas como el epitelio gastrointestinal o la barrera hematoencefálica.

Considerando las dificultades para determinar inmediatamente el impacto de esta estrategia en seres humanos, es necesario llevar a cabo un trabajo exhaustivo y sistemático de las propiedades de cada sistema, para resaltar las ventajas de usar nanotransportadores con ligandos superficiales en la etapa preclínica y poder determinar sus posibilidades de llegar a la clínica.

2. ANTECEDENTES

De los numerosos sistemas diseñados para la vehiculización y administración de fármacos, nuestro grupo trabaja activamente desde hace tiempo con micelas de gangliósidos [80-83].

Los gangliósidos son lípidos complejos pertenecientes a la familia de los glucolípidos o glucoesfingolípidos formados por una ceramida [84,85]; doble cola hidrofóbica compuesta por una esfingosina y un ácido graso; y una cabeza polar variable, compuesta por carbohidratos que incluye entre uno y cuatro monosacáridos unidos a una o más unidades de ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico, abreviado comúnmente como NANA (fig. 9).

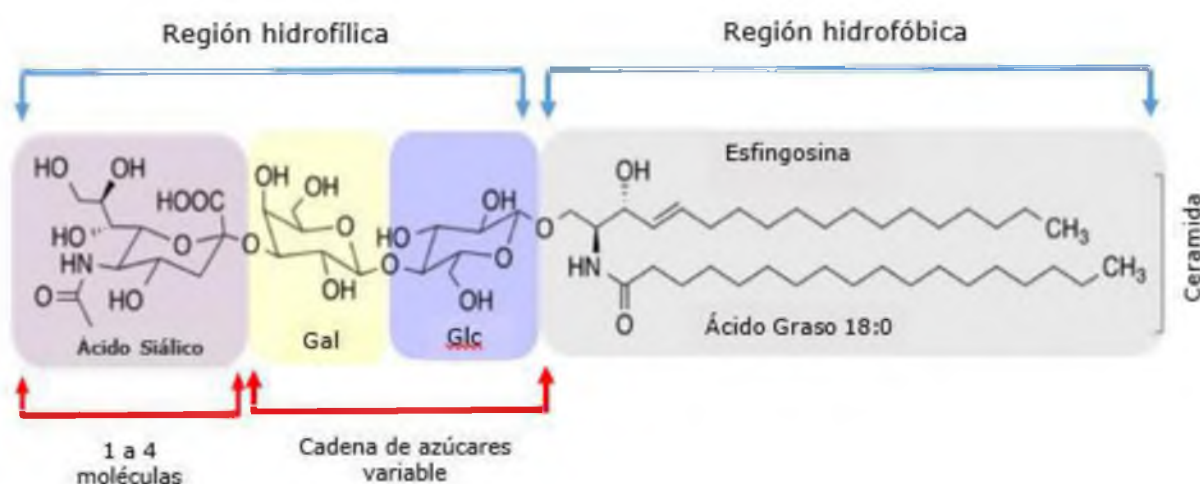


Figura 9: Estructura básica de los gangliósidos. La ceramida, formada por la unión de esfingosina y un ácido graso, constituye la región hidrofóbica común de los gangliósidos. La región hidrofílica es variable de acuerdo al contenido y secuencia de las moléculas de carbohidratos. Glc: Glucosa; Gal: Galactosa. El ácido siálico diferencia a los gangliósidos de los otros esfingolípidos. Adaptado de (101)

Por sus características anfipáticas, los gangliósidos en medios acuosos tienden a organizarse espontáneamente en estructuras en las que se distinguen dominios hidrofóbicos e hidrofílicos (fig. 10) [86,87]. La principal fuerza motriz para el autoensamblaje de estas moléculas anfifílicas es la disminución de la energía libre del sistema debido a la remoción de los fragmentos hidrófobos del entorno acuoso mediante la formación de un núcleo hidrofóbico estabilizado, protegido del medio acuoso circundante por los fragmentos hidrofílicos –efecto

hidrofóbico [88]. Se encuentran presentes predominantemente en el sistema nervioso, incrustados en la membrana plasmática donde presentan puntos de reconocimiento para las moléculas extracelulares o superficies de las células vecinas. Han sido implicados en una variedad de eventos de la superficie celular tales como fenómenos de reconocimiento, comunicación de célula a célula y biotransducción de información a través de membranas [89-92]. Se conoce además, que la cabeza polar formada de carbohidratos y ácido siálico puede funcionar como receptores específicos para ciertas hormonas glicoproteicas pituitarias, virus y toxinas bacterianas tales como la botulínica, tetánica y colérica [93,94]. Varios reportes han sugerido que los gangliósidos podrían exhibir una actividad antioxidante, en particular sobre la peroxidación lipídica [95,96] y la viabilidad de las neuronas del cerebro en ratas.

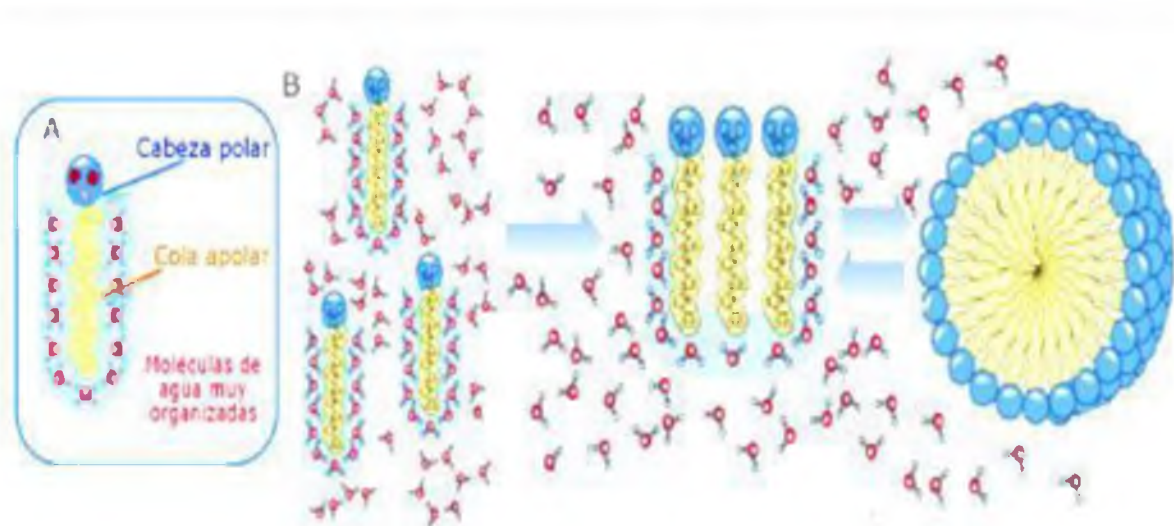


Figura 10: Esquema representativo de la formación de micelas a partir de moléculas anfifílicas. A) Lípidos o polímeros con cadena hidrocarbonada rodeada de moléculas de agua altamente ordenadas. B) Al agruparse en micelas reducen al mínimo la exposición de las regiones apolares al agua, minimizan la cantidad de moléculas de agua ordenadas y maximizan la entropía del sistema. La energía generada al liberar las moléculas de agua inmovilizadas estabiliza las micelas.

De los gangliósidos estudiados, el monosialogangliósido (GM₁) con cuatro azúcares en su cabeza hidrofílica (fig. 11) es el que demostró mayor capacidad para solubilizar y vehiculizar fármacos como Ptx y Doxo, lo que llevó a considerarlo la primera opción como nanotransportador para la administración parenteral de fármacos oncológicos. El GM₁ juega un papel importante en la regulación del Ca⁺² en el núcleo y el mantenimiento de la homeostasis neuronal [97]. Muchos estudios han mostrado que el GM₁ puede desempeñar una función neuroprotectora y neurorestauradora en la lesión neuronal, así como inducir la

neuritogénesis y promover la diferenciación celular [98-100]. Más importante aún, el GM₁ puede penetrar la BHE y utilizarse para tratar enfermedades neurológicas [101,102]. Administrado de forma exógena ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento clínico de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer [103]. Además, estos gangliósidos pueden ser obtenidos a partir de tejido cerebral bovino o porcino en los cuales presentan una alta abundancia relativa (GM₁ 21%) y separados fácilmente de los otros gangliósidos mediante procesos basados en la cromatografía de intercambio iónico o exclusión molecular [104].

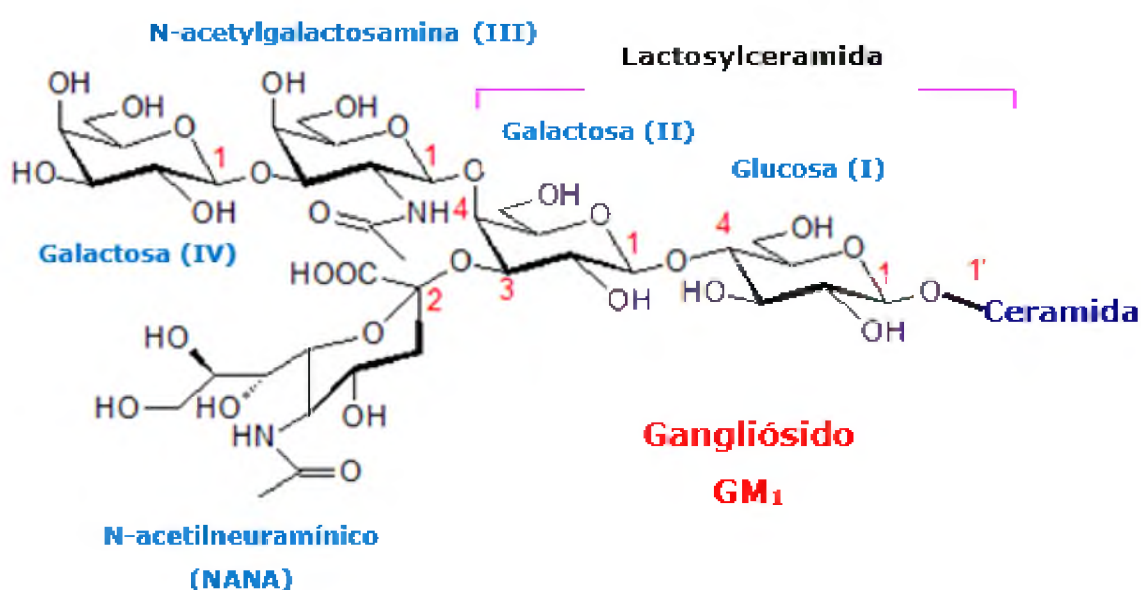


Figura 11: Estructura química del gangliósido GM₁. N-acetilneuramínico: NANA: Ácido siálico.

Las micelas de GM₁ presentan una concentración micelar crítica (CMC) entre 10^{-8} y 10^{-10} M, dato que refleja la gran estabilidad de estas estructuras especialmente cuando se las compara con micelas poliméricas cuyas CMC están en el orden de 10^{-3} a 10^{-5} M. De los numerosos resultados obtenidos en nuestro laboratorio cabe destacar que:

- ✓ Las micelas de GM₁ incorporan espontáneamente Ptx hasta un máximo de 6mg/ml, lo que representa un incremento en la solubilidad del fármaco de 6000 veces (Ptx en agua < $1\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e iguala la concentración presente en las formulaciones comerciales aprobadas de Ptx (Taxol® y Abraxane®) y Dtx (Taxotere®);
- ✓ Son capaces de incorporar Doxo hasta un máximo de $10\text{mg}.\text{ml}^{-1}$; una concentración cinco veces mayor que la presente en los productos comerciales

liposomales;

- ✓ Los complejos GM₁/fármaco resisten condiciones extremas de centrifugación a alta velocidad, diálisis prolongadas, ciclos de congelamiento-descongelamiento y ciclos de liofilización-solubilización, demostrando ser estables en solución acuosa al menos por 4 meses, conservados en refrigeración;
- ✓ No inducen hemólisis o agregación plaquetaria;
- ✓ La micela de GM₁ protege al taxano incorporado, reduciendo su hidrólisis a pH alcalino;
- ✓ Los complejos GM₁/fármaco tienen un tamaño promedio entre 10-15 nm y un peso molecular mayor a 40KDa, cumpliendo los requisitos necesarios para evitar la rápida eliminación del organismo;
- ✓ Son capaces de liberar los fármacos encapsulados al entrar en contacto con células;
- ✓ El efecto citotóxico *in vitro* de los fármacos vehiculizados es similar al de los fármacos libres;
- ✓ Las micelas pueden incorporar de forma espontánea y secuencial Ptx y Doxo, ofreciendo la posibilidad de combinar más de un fármaco en el sistema.

Este conjunto de resultados dio lugar a una patente de propiedad intelectual internacional (WO2011/113981 A1) [105] que actualmente se encuentra en vigencia en diversos países, incluido los EEUU, y en la cual se describe el potencial que poseen las nanomicelas auto-ensambladas de GM₁ como sistemas de vehiculización de fármacos para administración parenteral.

Para optimizar la actividad terapéutica de este sistema micelar se requiere de su localización en el lugar específico del organismo donde el fármaco va a desarrollar su actividad. El propósito de la localización, además del control de la liberación de los fármacos, es la búsqueda de una mayor eficacia mediante la alteración de ciertas características como su farmacocinética, farmacodinamia, su toxicidad no-específica, la inmunogenicidad y el bioreconocimiento de los sistemas. En este sentido, un resultado importante observado durante la investigación fue que los complejos GM₁/Ptx y GM₁/Doxo son capaces de interaccionar con Alb, dando lugar a complejos ternarios GM₁-Alb/fármaco estables [106]. Hecho que podría resultar en una ventaja adicional para formulaciones de fármacos oncológicos porque existen evidencias de que células tumorales expresan moléculas o receptores específicos para la Alb. Mediante estos receptores se podría direccionar específicamente el fármaco al tejido

tumoral. Este es el fundamento en el que se basa el producto comercial Abraxane®.

La interacción con Alb es un ejemplo de funcionalización activa que es capaz de llevarse a cabo con estas micelas, pero no es el único.

La localización o direccionamiento de un sistema transportador de fármacos depende de su tamaño y de sus propiedades físico-químicas como carga eléctrica, equilibrio de fuerzas hidrofóbicas y polares superficiales (hidrofobicidad/hidrofiliidad), capas de recubrimiento y de los grupos funcionales sobre su superficie, los cuales se pueden ajustar a través de la funcionalización. Precisamente, las propiedades físico-químicas que presentan estas micelas como su BHL, dado por la cubierta hidrofílica esencialmente iónica y las regiones internas hidrofóbicas, su carga superficial negativa, aportada por las moléculas de ácido siálico expuestos al medio acuoso y su densidad de carga superficial permiten plantear la posibilidad de incorporar otros ligandos como inmunoglobulinas, péptidos, lipoproteínas mediante métodos no covalentes. La adsorción física inducida por interacciones hidrofóbicas (Van der Waals, dipolo-dipolo) entre regiones hidrofóbicas de los ligandos y los transportadores es el método más usado para unir la mayoría de los ligandos hidrofóbicos, incluidas las inmunoglobulinas. En el caso de ligandos menos hidrófobos, la unión puede tener lugar a través de interacciones iónicas e hidrofóbicas. En este sentido, las micelas de GM₁ han demostrado ser estructuras versátiles, altamente dinámicas capaces de reorganizarse, ensamblar o retirar monómeros en función de las propiedades fisicoquímicas de la molécula con la que interacciona.

Por otra parte, la presencia de los grupos carboxílicos del ácido siálico disponibles en su cubierta hidrofílica pueden ser utilizados para unir de forma covalente ligandos como el AF, aminas, oligonucleótidos, entre otros.

Considerando los antecedentes mencionados, sumado a la importancia de dar direccionalidad o especificidad a los tratamientos con fármacos oncológicos, nos propusimos funcionalizar las micelas de GM₁ con ligandos específicos para lograr la mejora del sistema o como alternativa para satisfacer las necesidades de tratamientos más específicos y menos tóxicos.

3. OBJETIVOS

La hipótesis de la cual partimos postula que la incorporación de una molécula de reconocimiento celular en la superficie de micelas de monosialogangliósidos (GM₁), puede ser utilizada como estrategia de direccionamiento activo de fármacos a células tumorales.

3.1 Objetivo General

Modificar la superficie de micelas de gangliósidos (GM₁) mediante la incorporación de moléculas o ligandos denominados de reconocimiento celular (ácido fólico, anticuerpos monoclonales, poliaminas, lipoproteínas) con el objetivo de direccionar la acción biológica del fármaco a células tumorales, mediante la utilización de paclitaxel y doxorubicina como modelos de fármacos anti-tumorales.

3.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la incorporación de moléculas de reconocimiento celular: A) espermidina, B) anticuerpos monoclonales, C) lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL) y D) ácido fólico a la superficie de micelas de gangliósidos (GM₁) a partir de la influencia de variables físico-químicas como la temperatura, pH y fuerza iónica del medio, así como de diferentes métodos de conjugación química.
2. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las micelas de gangliósidos que logren incorporar de manera eficiente moléculas de reconocimiento celular (ácido fólico, anticuerpos monoclonales, lipoproteínas). Determinar la eficiencia de vehiculización de los fármacos en estudio respecto a las micelas sin modificar.
3. Determinar las actividades farmacológicas *in vitro* de las micelas modificadas sobre líneas celulares normales y tumorales, mediante distintas estrategias de evaluación del efecto citotóxico.
4. Analizar la estabilidad de los complejos nanoestructurados compuestos por micela GM₁-fármaco-molécula de reconocimiento celular evaluando la cantidad

de ligando unido a diferentes tiempos y temperatura.

4. CAPÍTULO 1

Incorporación de espermidina a la superficie de micelas de GM₁

4.1 Resumen

La capacidad de la espermidina, una poliamina biógena, para aumentar la selectividad de agentes anticancerígenos se ha estudiado extensamente durante décadas. En este capítulo se presentan resultados que demuestran que es posible incorporar de forma estable esta poliamina en la superficie de micelas de GM₁ y se caracteriza su comportamiento para la vehiculización de fármacos.

La incorporación, mediante conjugación covalente de la espermidina al ácido siálico de los gangliósidos produce una clara reducción del potencial zeta electronegativo de la superficie micelar, dando como resultado lo que definimos como micelas zwitteriónicas. Con respecto al tamaño, los estudios de dispersión de luz dinámica no muestran diferencias significativas entre ambas micelas, mientras que la imagen de microscopía electrónica de transmisión muestra un tamaño más pequeño de las micelas de GM₁-espermidina respecto de las de GM₁. Las micelas modificadas mantienen la capacidad de incorporar fármacos antitumorales hidrofílicos e hidrófobos y la conjugación no afecta la estabilidad de las micelas/fármaco en solución.

Los estudios en cultivos de células muestran que las micelas de GM₁ modificadas con espermidina y cargadas con Doxo, liberan más rápido al fármaco en las células en comparación con las micelas GM₁-Doxo; sin embargo, no contamos con evidencia que nos permita demostrar la participación de un sistema de transporte específico de poliaminas en la captación de las micelas modificadas.

En conclusión, si bien las micelas de GM₁ modificadas con espermidina y las micelas sin modificar muestran propiedades físicas similares, las micelas GM₁-espermidina favorecen la internalización de los fármacos vehiculizados, lo que nos permiten considerar a las mismas como una alternativa interesante a seguir

evaluando en la búsqueda de sistemas de administración de fármacos más eficientes.

4.2 Introducción

Los grandes avances realizados hasta la fecha en la comprensión de los complejos mecanismos del cáncer no han sido acompañados de igual manera en la mejora de su tratamiento, lo que sigue siendo uno de los principales problemas en salud humana. En este sentido, la quimioterapia sigue siendo una de las prácticas más utilizadas, aunque muchos efectos secundarios graves se derivan de una serie de factores que incluyen la toxicidad y la falta de especificidad de tejido. El uso de nanopartículas, incluyendo liposomas, polímeros, dendrímeros y micelas, como transportadores o vehículo de los agentes quimioterapéuticos ha permitido mejorar la capacidad de carga de fármacos, el tiempo de permanencia en la circulación, la permeabilidad en el tejido tumoral y, especialmente, la biodistribución de los fármacos en el organismo. Sin embargo, el factor más importante, la especificidad de acción, es aún demasiado escasa. Muchas moléculas o ligandos han sido estudiados con el fin de acoplarlos a los nanotransportadores para mejorar la especificidad de acción de estos vehículos, sobre la base de su interacción específica con receptores de interés; algunas de las moléculas estudiadas incluyen anticuerpos, péptidos, aptámeros y diversos compuestos catiónicos de bajo peso molecular. Las poliaminas pertenecen a este último grupo de moléculas, ya que son policationes alifáticas altamente cargados de bajo peso molecular, ampliamente distribuidos en todas las células vivas. Las tres poliaminas principales en las células de mamíferos son la putrescina (PUT), espermidina (SPD) y espermina (SPM) [107].

En las últimas décadas, el interés por las poliaminas naturales ha aumentado debido a su participación en una serie de procesos celulares. La concentración de las poliaminas es mantenida dentro de un intervalo muy estrecho; su disminución inhibe la proliferación celular, mientras que su exceso conduce a efectos tóxicos. Están estrictamente reguladas por una compleja red de biosíntesis, catabolismo y mecanismos de transporte que todavía siguen siendo poco conocidos en las células normales [108,109]; sin embargo, su metabolismo está a menudo desregulado durante el crecimiento de diversas células

neoplásicas. Por ejemplo, se ha reportado la presencia de altas concentraciones de N1-(3-2 aminopropil)-1,4-butanodiamina (SPD, 1) en células que proliferan rápidamente [110]. Esta elevada concentración de poliaminas juega, en todas las etapas, un rol central en el desarrollo del cáncer, que desde el principio, mantiene el fenotipo transformado [111-113]. Un mecanismo por el cual las células cancerosas incrementan las concentraciones intracelulares de poliaminas se basa en aumentar la captación o absorción de poliaminas preformadas desde el entorno extracelular, a través del sistema de transporte de poliaminas (PTS, sigla en inglés) [108,114-116].

Varios reportes describen el uso de este PTS para la internalización celular de moléculas conjugadas a la cadena principal de la poliamina [117-119]. Esta estrategia de conjugar fármacos a poliaminas para mejorar la actividad citotóxica ha sido ampliamente descrita en las últimas décadas. La unión de un agente quimioterapéutico a la espermidina podría mejorar su actividad, ya sea por el aumento de la absorción (a través de los sistemas de captación de poliaminas) o simplemente por la competencia de las poliaminas por su unión específica a las células.

Sobre la base de la evidencia anterior, en este capítulo evaluamos el acoplamiento covalente de una poliamina, espermidina, a la superficie de un nanotransportador cargado con fármacos antitumorales como una nueva alternativa quimioterapéutica. La espermidina, nombre común de la N'-(3-aminopropil) butano-1,4-diamina, de fórmula molecular semidesarrollada $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$, consta de una cadena alifática con tres grupos amino, dos de ellos primarios —uno en cada extremo— y uno secundario. El nanotransportador es la nanoestructura micelar altamente aniónica, compuesta de sialoesfingolípidos (GM_1), capaz de transportar fármacos como Ptx y Doxo con alta eficiencia [80-82,106].

En este contexto, modificamos el ácido siálico presente en la superficie de las micelas de GM_1 a través de su unión a los grupos aminos presentes en la espermidina, para obtener micelas GM_1 -espermidina. Porter et al. [120] demostró que la molécula de espermidina puede ser modificada considerablemente en la posición N_4 y aun así ser capturada e internalizada por el PTS. En este trabajo, describimos la caracterización física, química, funcional y biológica de estas micelas de GM_1 modificadas con espermidina.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Materiales

-El Ptx, es de Yunnan Smandbet Co. Ltd. (Kumming, China). Las soluciones madres se prepararon disolviendo el Ptx dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 20 mg.mL⁻¹ y 50 mg.mL⁻¹ respectivamente.

-La Espermidina (Número CAS: 124-20-9) de fórmula molecular C₇H₁₉N₃ ≥98% de pureza y 1-[3-dimetil amino propil]-3-metiodida etilcarbodiimida fue comprado de Sigma-Aldrich.

-La Doxo fue un obsequio de NANOX S.A. La solución madre se preparó en solución fisiológica a una concentración de 6 mg.ml⁻¹.

-El GM₁ purificado de cerebro porcino como sal de sodio, fue provisto por TRB Pharma S.A. Las soluciones madres de GM₁ se prepararon disolviendo los gangliósidos en agua bidestilada a una concentración final de 250 mg.mL⁻¹. Después de 24 h a 4-8 °C, se centrifuga durante 15 min a 50.000g y el sobrenadante se filtra a través de 0,22 micras.

-Las columnas Superdex-G-200 fueron comprados de GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).

-Todos los demás reactivos de grado analítico se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania) y se usaron como se recibieron.

-Para los cultivos celulares se utilizó medio de cultivo MEM (medio esencial mínimo) suplementado con suero fetal bovino irradiado (NATOCOR, Córdoba, Argentina) al 1 o al 10 % (v/v) según condiciones de mantenimiento o de crecimiento respectivamente.

4.3.2 Métodos

4.3.2.1 Conjugación de la espermidina a las micelas de GM₁

La conjugación se llevó a cabo utilizando un método de activación de grupos carboxílicos, similar al descrito en otros trabajos [121]. Este método utiliza carbodiimida (agente activante), en condiciones bajo las cuales una de las moléculas contenga una amina y la otra un grupo carboxílico para la formación de enlaces amidas o ésteres.

A partir de la solución madre de GM₁, se prepararon soluciones de 20 mg.mL⁻¹ en buffer MES pH 4,5 24 h antes de su utilización; a continuación, la solución se incubó con un exceso entre 5 y 10 veces de 1-[3-dimetil amino propil]-3-etilcarbodiimida metiodida (EDC metiodida) durante 60 minutos a 25°C. Luego, se añadió un exceso molar de 1 a 10 veces de la solución de espermidina a la solución de GM₁ activado y se incubaron otras 2 horas a 25°C. La espermidina libre se separó del GM₁ conjugado por diálisis contra buffer PBS (pH 7,4), por 24 h a la misma temperatura.

La cantidad de espermidina conjugada se determinó midiendo nitrógeno total, siguiendo el método de Dumas en un analizador de nitrógeno LECO FP-2000 (Leco Instruments GmbH, Mönchengladbach, Alemania, UST-ID). El nitrógeno de la espermidina fue calculado a partir de la diferencia medida entre las micelas de GM₁-espermidina dializadas y micelas de GM₁ solas. Por último, la concentración de espermidina se obtuvo extrapolando el contenido de nitrógeno con la concentración de espermidina obtenida a partir de una curva conocida de una solución estándar.

4.3.2.2 Eficiencia de las micelas de GM₁-espermidina en la carga de Paclitaxel

Para determinar la capacidad de carga de las micelas de GM₁-espermidina, adicionamos concentraciones crecientes de Ptx sobre estas micelas, utilizando el mismo procedimiento descrito para cargar micelas de GM₁ [80], estandarizado en nuestro laboratorio.

Brevemente, se incubaron micelas de GM₁-espermidina, a una concentración de 10 mg.mL⁻¹, con una solución madre de Ptx en DMSO para alcanzar relaciones molares GM₁/Ptx de 50/1 a 1/1, bajo agitación suave durante 30 min a 20°C. Después de permanecer 24 horas a 4°C, las muestras se dializaron por 24 h más a la misma temperatura para eliminar el DMSO.

La cuantificación de Ptx se llevó a cabo por HPLC (High-performance liquid chromatography). Para ello, el Ptx fue extraído de las micelas con 10 volúmenes de acetato de etilo. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 2.500g por 5 min, la fase orgánica se transfirió a un tubo limpio y se evaporó a sequedad a 40°C. El residuo seco se disolvió en 1 volumen de etanol. Finalmente, la concentración de Ptx fue medida con una columna Curosil B C18 (250 x 3,20 mm

I.D., con un tamaño de partícula de 5 μm) y una pre-columna Curosil B C18 (30 x 4,60 mm I.D., con un tamaño de partícula de 5 μm) adquiridas de Phenomenex. La cromatografía fue realizada a 20 °C, con 60 % (v/v) acetonitrilo y 40 % (v/v) agua bidestilada como fase móvil. Se corrió a una velocidad de flujo de 0,7 mL.min⁻¹ monitoreando el eluyente a 227 nm. La validación del método se llevó a cabo según la guía de la FDA para la Validación de Métodos Bioanalíticos.

4.3.2.3 Eficiencia de las micelas de GM₁-espermidina en la encapsulación de Doxorrubicina

La capacidad de las micelas modificadas para cargar Doxo se determinó mezclando micelas de GM₁-espermidina a una concentración de 10 mg.mL⁻¹ con el fármaco en solución fisiológica, hasta obtener relaciones molares GM₁/Doxo entre 50/1 y 1/1. El procedimiento fue igual al utilizado para la incorporación de Doxo en micelas de GM₁ descrito anteriormente [81]. Brevemente, después de mezclar y dejar en agitación suave 30 min a 20°C, las mezclas se mantuvieron durante 24h a 4°C. Luego, se dializaron por 24 h a 4°C frente a agua bidestilada para separar la Doxo soluble no incorporada en las micelas.

La concentración de la Doxo en las micelas GM₁-espermidina se determinó mediante espectrofotometría UV-visible, midiendo la absorbancia a 490 nm (longitud de onda de máxima absorción) contra una curva de calibración realizada con una solución estándar de Doxo en solución fisiológica.

4.3.2.4 Determinación de la concentración de gangliósidos

La concentración de GM₁ fue medida por el método colorimétrico de resorcinol modificado, donde se determina el contenido de ácido siálico [80]. Brevemente, a la muestra contenida en 1 ml se le añade 1 ml de reactivo de resorcinol y se calienta a 100 °C por 15 min. (Reactivo de resorcinol: 2 mg de resorcinol disueltos en 0,1 ml de agua bidestilada + 0,8 ml de HCl 37,9% (w / v) + 2,5 μl de 0,1 M + cantidad de agua bidestilada suficiente para llegar a un volumen final de 1 ml). Luego, se deja que las muestras se enfríen y el cromóforo desarrollado se extrae con 2,5 ml de n-butil acetato: n-butanol (85/15 vol/vol). Esta solución se centrifuga a 2500g por 5 min y se determina la absorción de los sobrenadantes a 580 nm.

4.3.2.5 Caracterización físico-química de las micelas GM₁-espermidina

4.3.2.5.1 Tamaño y distribución de partículas

El tamaño medio y la distribución de tamaños (IP) de las micelas GM₁-espermidina se evaluó mediante dispersión de luz dinámica (Dynamic light Scattering) usando un analizador de tamaño de partículas Delsa™Nano Submicron (Beckman Coulter Instruments) a un ángulo fijo de dispersión de 165°. Las micelas fueron diluidas con buffer PBS pH 7,4 y filtradas antes de la medición. Los datos se analizaron con el software Delsa Nano Beckman Coulter (versión 2.2) proporcionado por el fabricante con el método de análisis CONTIN. Todas las mediciones se realizaron por triplicado, para cada uno de tres lotes independientes de micelas.

6.3.2.5.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La morfología de las micelas fue determinada mediante microscopía electrónica de transmisión utilizando un equipo JEOL JEM-1200 EX II a 250000 aumentos. Se cargaron 50 µl de cada muestra en una rejilla de carbono, se incubaron por 5 min y luego se dejó secar. Luego, las rejillas fueron incubadas con 50 µl de una solución de acetato de uranilo al 10 % por 1 min y se secaron para su posterior observación al microscopio.

4.3.2.5.3 Determinación de la carga neta superficial de las micelas GM₁-espermidina

El potencial zeta de micelas de GM₁, GM₁-espermidina y GM₁-espermidina/Ptx se determinó usando un analizador Delsa™Nano zeta potential analyzer (Beckman Coulter Instruments,) a temperatura ambiente. Las muestras se prepararon con buffer PBS (145mM de NaCl) pH 7,4 y filtradas antes de la medición. El potencial zeta se determinó por triplicado y los resultados se calcularon automáticamente por el analizador.

4.3.2.5.4 Cromatografía de Exclusión por tamaño

El análisis cromatográfico de las distintas muestras fue realizado en un Akta Explorer 100 (GE Healthcare) usando una columna Superdex G-200 equilibrada con buffer fosfato salino (145mM de NaCl) pH 7,4, a una velocidad de 0,4 ml.min⁻¹. El perfil de elución de las micelas analizadas, como el de los fármacos encapsulados, fueron monitoreados con un detector UV-visible a 227 y 490 nm, según el fármaco. Las concentraciones de GM₁ y de los fármacos fueron cuantificados como se mencionó previamente.

4.3.2.6 Citotoxicidad *in vitro* de los fármacos vehiculizados en micelas GM₁-espermidina

Se utilizaron las líneas celulares Hep-2 (carcinoma epitelial de laringe humano) y HeLa (carcinoma epitelial de cuello uterino humano) que se cultivaron en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino a 37 °C y con un 5 % de CO₂. Las monocapas de las células cultivadas a confluencia en placas de 96 pocillos se incubaron con concentraciones crecientes de micelas de GM₁/Doxo o GM₁-espermidina/Doxo a diferentes tiempos (30, 60, 90 y 120 min), luego de lo cual se reemplazó el medio con la muestra por medio sin suero y se dejó 24 h a 37°C con un 5 % de CO₂. Pasadas las 24 h, se lavó la placa con PBS y se determinó el remanente de células mediante tinción con cristal violeta. El cristal violeta es un triarilmetano que se une al ADN celular. Normalmente, en cultivos celulares adherentes, las células muertas se desprenden lo que facilita su remoción mediante lavados con PBS. Así, luego del lavado, las células remanentes fueron fijadas con formol 10% y teñidas con una solución de cristal violeta al 0,4% en metanol durante 15 minutos. Finalmente, las células fueron cuidadosamente lavadas y se añadió una solución de ácido acético al 5% para homogeneizar y determinar color. En la tinción con cristal violeta, la masa celular remanente es directamente proporcional a la intensidad de color medida a 570 nm. El análisis cuantitativo (evaluación colorimétrica de las células fijadas) se realizó mediante absorción a 570 nm en un lector de placas automatizado (Bio-Rad, CA, EE.UU.). Los resultados representan valores medios de cinco mediciones y sus respectivas desviaciones. La evaluación estadística entre las muestras cotejadas se realizó mediante la prueba *t* de Student para dos

muestras independientes o ANOVA para más de dos muestras; se eligieron valores de $p < 0.05$ para indicar un nivel de significancia diferente.

Los ensayos con Ptx se llevaron a cabo utilizando el mismo protocolo que el descrito para Doxo. Se realizaron además, controles con espermidina, micelas de GM₁ y micelas de GM₁-espermidina para excluir el efecto de los componentes del vehículo.

4.4 Resultados

4.4.1 Modificación de la superficie de micelas de GM₁ con espermidina.

La presencia de ácido siálico en la cabeza polar de las micelas de GM₁, fue lo que nos permitió plantearnos la idea de incorporar una poliamina como la espermidina en la superficie micelar mediante conjugación covalente.

Las micelas de GM₁-espermidina se prepararon utilizando un método simple de dos pasos como se mencionó anteriormente. La activación del ácido siálico del GM₁ se realizó con carbodiimida y a continuación se añadió un exceso de espermidina para establecer uniones tipo amida entre ambos (fig. 12).

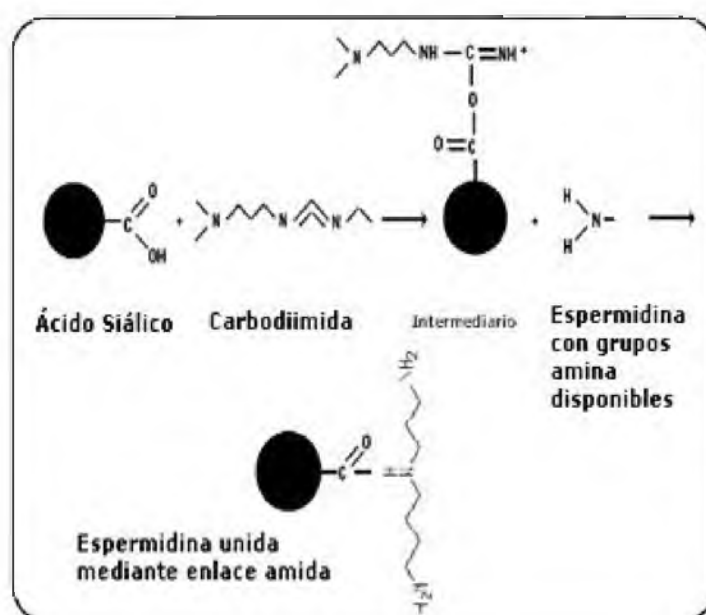


Figura 12: Método de conjugación mediado por grupos carboxílicos

Este procedimiento condujo a la formación de agregados micelares de color blanco y aspecto lechoso. Esta agregación podría deberse a dos factores, a la

formación de complejos supramoleculares originados por la propia interacción covalente, o bien, a interacciones no covalentes, tipo electrostáticas, entre la espermidina conjugada a las micelas y grupos siálico libres de otras micelas.

Con el objeto de indagar sobre estas posibilidades, evaluamos el efecto de la concentración salina sobre el fenómeno de agregación y observamos que la adición de fuerza iónica (>100 mM) produjo una rápida disociación de los agregados, lo que lleva a la obtención de una solución ópticamente transparente (DO a 600 nm $< 0,1$). Este resultado confirma que la interacción involucrada en la formación de los agregados es de tipo electrostática, entre las micelas de GM_1 -espermidina con moléculas de siálico no conjugadas de GM_1 -espermidina.

De acuerdo con las mediciones de nitrógeno total proveniente de las muestras de GM_1 -espermidina en relación con las de GM_1 , la espermidina se conjugó con un 25-30% de las moléculas de GM_1 . Mayores concentraciones de espermidina o reactivo de conjugación no mejoraron este porcentaje, lo que sugiere que se trata de la máxima capacidad de unión de la espermidina a la micela.

4.4.2 Caracterización de las micelas espermidina- GM_1

El diámetro medio (DM), índice de polidispersidad (IP) y potencial zeta (ζ) se determinaron en el analizador Delsa™Nano como se describió en la sección anterior (4.3.2.5.1). El análisis del tamaño de partículas por dispersión de luz dinámica de las micelas GM_1 -espermidina mostró una distribución de población homogénea con un radio hidrodinámico promedio de $11,8$ nm ($IP < 0,1$) (Tabla II). Este valor es ligeramente inferior al encontrado para las micelas de GM_1 no modificadas. Del mismo modo la polidispersidad de estas nuevas micelas fue sustancialmente menor, lo que muestra una distribución de tamaños más homogénea.

Tabla II: Características físico-químicas de las micelas GM_1 y GM_1 -espermidina.

Parámetros	Micelas	
	GM_1	GM_1 -espermidina
Diámetro medio (DM)	15 ± 3	$11,8 \pm 3$
Índice de Polidispersidad (IP)	$0,17 \pm 0,04$	$0,098 \pm 0,002$
Potencial Zeta ζ (mV)	-7.35 ± 0.96	-0.14 ± 0.97

Resultados similares fueron obtenidos mediante la observación por microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes de la fig. 13 muestran, en ambos tipos de micelas, una sola población de estructuras esféricas con un diámetro comprendido entre 11 y 15 nm.

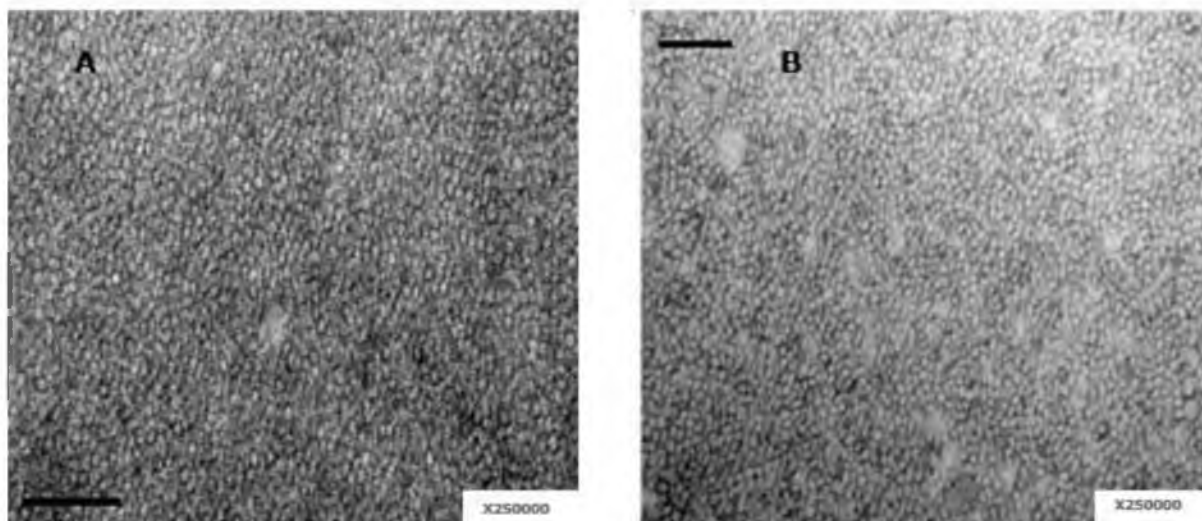


Figura 13: Micrografía electrónica de: (A) micelas de GM₁ y (B) micelas de espermidina-GM₁. El tamaño de barra es de 100 nm. Aumento X250000

Con respecto a las determinaciones del potencial zeta se observó, como era de esperar, una marcada disminución en la carga superficial negativa de las micelas de GM₁-espermidina comparado al obtenido con las micelas de GM₁ sin modificar, de -7,35 para GM₁ a -0,14 para GM₁-espermidina (Tabla II). Este resultado está en concordancia con los datos anteriores que muestran que no todos los grupos siálicos están unidos covalentemente a la espermidina. Sugiere asimismo, que las moléculas catiónicas fueron incorporadas en la superficie de las micelas, dando como resultado lo que definimos como micelas zwitteriónicas.

4.4.3 Capacidad de las micelas de GM₁-espermidina de encapsular fármacos

En trabajos previos [80] se señaló que la modificación de la porción oligosacárida de las micelas, por lactonización de su ácido siálico, conduce a una reducción significativa (~40%) en su capacidad para solubilizar Ptx.

Sobre la base de esos resultados, se evaluó la capacidad de las micelas de GM₁ modificadas con espermidina, para cargar Ptx y Doxo. Además, se comparó el

comportamiento cromatográfico de las micelas de GM₁-espermidina/Ptx con el de las micelas de GM₁/Ptx.

La fig. 14 muestra que el perfil de incorporación de Ptx y Doxo en las micelas de GM₁-espermidina es bastante similar al descrito anteriormente para las micelas de GM₁ (fig. 14A y B). Estudios por HPLC confirmaron que la capacidad máxima de carga del Ptx se alcanza aproximadamente en la relación molar GM₁-espermidina/Ptx 5/1 (relación molar GM₁/fármaco), lo que representa alrededor de 2,2 mg.ml⁻¹ de Ptx en 20 mg.ml⁻¹ de micelas de GM₁-espermidina. En estas condiciones, las soluciones acuosas de GM₁-espermidina/Ptx obtenidas se mantienen estables y ópticamente transparente ($DO \leq 0,1$ a 600nm) por lo menos durante 4 meses bajo refrigeración a 8 °C.

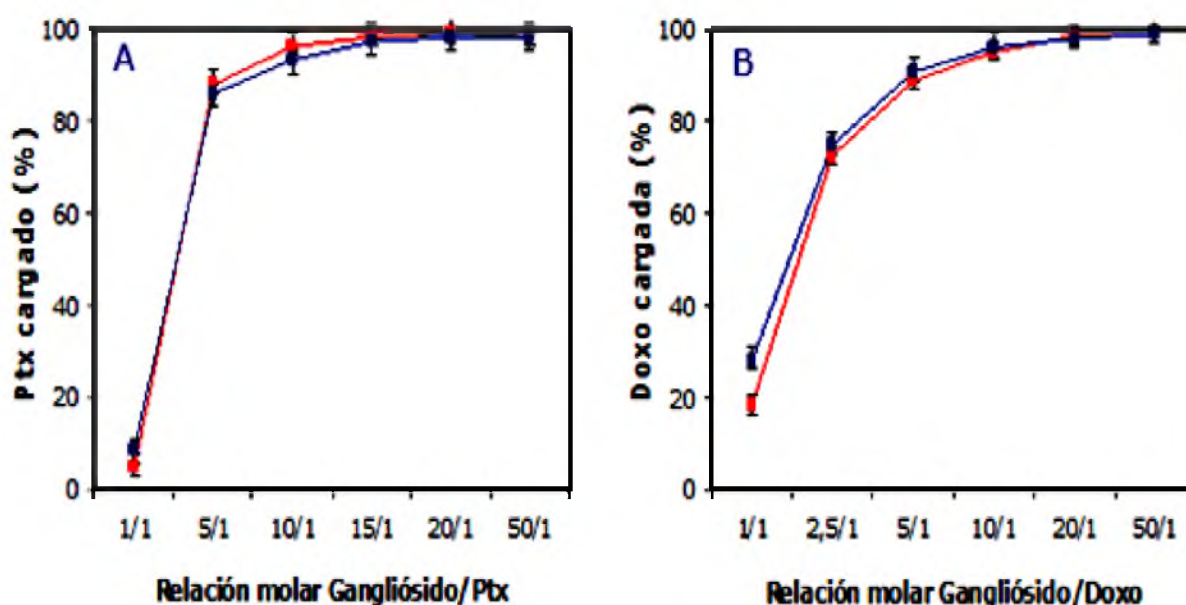


Figura 14: Capacidad de las micelas de GM₁-espermidina (—■—) y GM₁ (—■—) para incorporar fármacos. **A:** Incorporación de Ptx y **B:** Incorporación de Doxo; a diferentes relaciones molares Gangliósido/fármaco. Las barras de error indican la DS de la media ($n = 5$)

Dentro del marco de la caracterización estructural de las micelas de GM₁-espermidina, se analizaron muestras de GM₁/Doxo y GM₁-espermidina/Doxo (relación molar 10/1) en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño, donde las partículas se separan de acuerdo a su radio hidrodinámico. Como se observa en los perfiles de elución (fig. 15), las micelas de GM₁-espermidina eluyen a un volumen mayor respecto a las micelas de GM₁, lo que indica una disminución de su radio hidrodinámico promedio. Resultados similares se obtuvieron cuando el fármaco encapsulado fue Ptx.

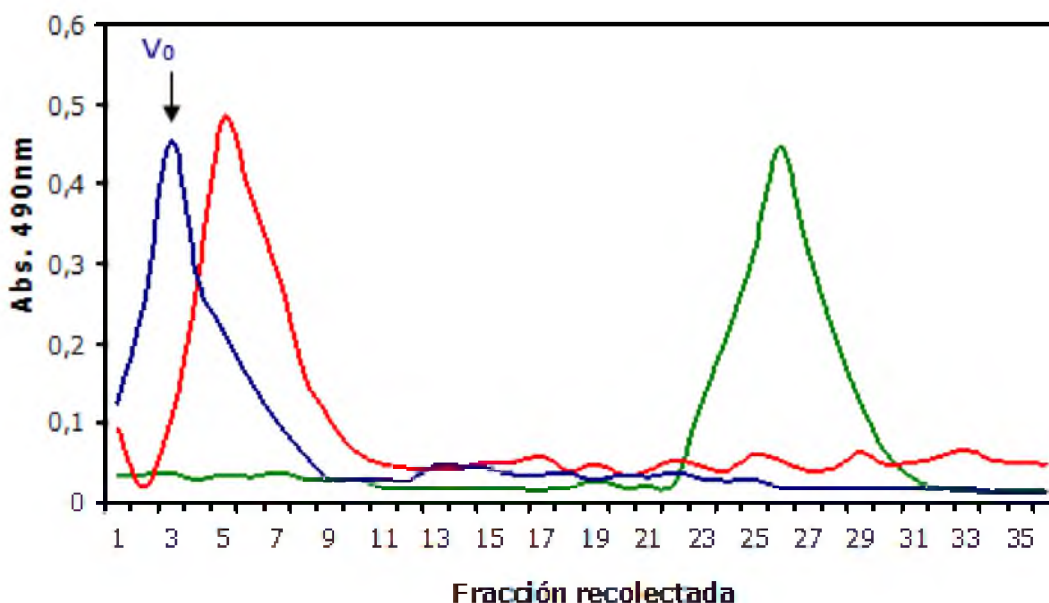


Figura 15: Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM₁ y GM₁-espermidina con Doxo (GM₁/Doxo 10/1 mol/mol). Cromatografía por Superdex G-200® de Doxo (—), micelas de GM₁/Doxo (—) y GM₁-espermidina/Doxo (—) a 20°C y pH 7,4.

De la misma forma, se utilizó la cromatografía de exclusión por tamaño para evaluar la influencia de la carga de la Doxo en las micelas de GM₁-espermidina sobre la estabilidad del complejo. Para ello, se analizó el comportamiento cromatográfico de diferentes relaciones molares de GM₁-espermidina/Doxo. La fig. 16 muestra que a medida que la relación molar entre GM₁-espermidina/Doxo disminuye desde 10/1 a 1/1, se observa la co-elución del fármaco con las micelas de GM₁-espermidina, mostrando claramente una asociación física entre ellos. Sin embargo, en la relación molar de 2,5/1 aparece un nuevo pico superpuesto con el perfil de elución de la Doxo libre, lo que sugiere que el sistema comienza a saturarse. Al aumentar la concentración de Doxo a una relación molar 1/1, el comportamiento cambia drásticamente y el pico del complejo GM₁-espermidina/Doxo se desplaza hacia pesos moleculares más bajos, con menor contenido de Doxo; la mayor parte del fármaco comienza a eluir como Doxo libre. La cuantificación espectrofotométrica determinó que la capacidad máxima de carga de Doxo se alcanza aproximadamente en la relación molar 5/1, lo que representa una concentración de 0,7 mg.ml⁻¹ de Doxo en 10 mg.ml⁻¹ de micelas de GM₁-espermidina.

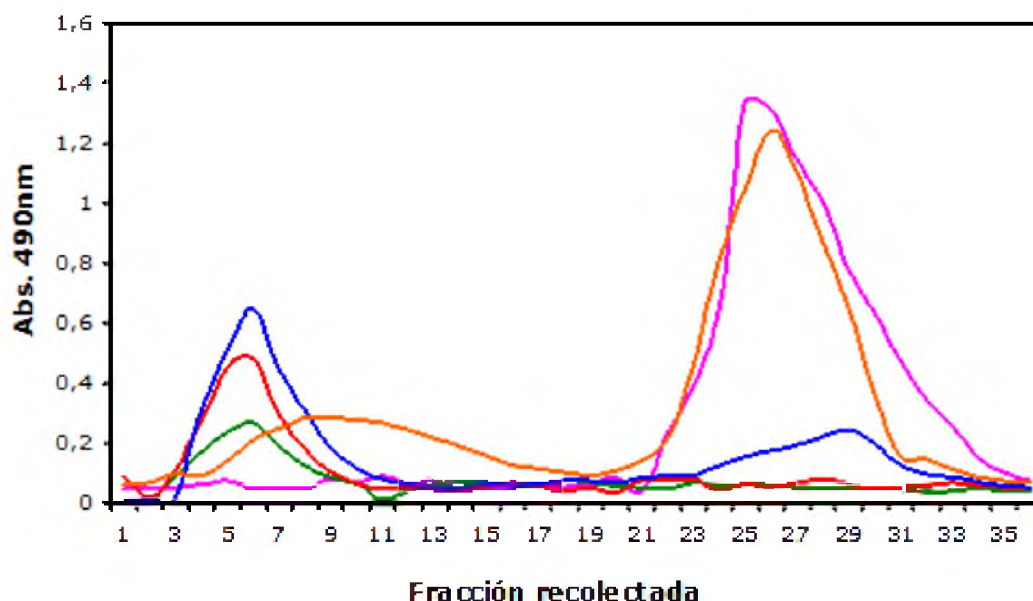


Figura 16: Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas GM₁-espermidina con diferentes cantidades de Doxo. Cromatografía en Superdex G-200® de Doxo (—) y micelas de GM₁-espermidina/Doxo a: 10/1 (—); 5/1 (—); 2,5/1 (—) y 1/1 (—) relaciones molares (GM₁/Doxo)

En todos los casos, las micelas de GM₁-espermidina/Doxo, al igual que GM₁-espermidina/Ptx permanecieron estables y ópticamente transparentes ($DO \leq 0,1$ a 600nm), sin precipitación, liberación de fármacos o alteración de sus propiedades fisicoquímicas tales como tamaño y potencial zeta durante el período de almacenamiento de 4 meses a 4-8 °C.

4.4.4 Actividad biológica *in vitro* de la Doxo cargada en micelas de GM₁-espermidina

En estudios previos se demostró que la Doxo cargada en micelas de GM₁ tiene un efecto citotóxico sobre cultivos de células similar al de la Doxo libre [81]. En este trabajo, evaluamos si la modificación de la superficie de la micela con espermidina produce algún cambio en la actividad biológica del fármaco sobre el cultivo celular. Con este fin, se evaluó el efecto de Doxo cargada en micelas de GM₁-espermidina, respecto del efecto de GM₁/Doxo, sobre líneas celulares Hep-2 y HeLa.

La fig. 17 muestra la viabilidad de las células Hep-2 después de la incubación con GM₁/Doxo y GM₁-espermidina/Doxo a tiempos de 30, 60, 90 y 120 min y concentraciones de Doxo de 10, 25 y 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Los resultados muestran que la

viabilidad celular disminuyó proporcionalmente con el aumento de la concentración del fármaco y el tiempo de exposición. Además, en un rango estrecho de tiempo y concentración se observó una disminución de la viabilidad de las células tratadas con GM₁-espermidina/Doxo respecto de las tratadas con GM₁/Doxo, lo que sugiere diferencias en la cinética de interacción y liberación del fármaco entre ambas micelas. Los resultados obtenidos con células HeLa fueron similares a los obtenidos con Hep-2.

Por otra parte, los controles de toxicidad realizados con espermidina y micelas GM₁-espermidina no mostraron actividad citotóxica en las células en las condiciones de ensayo (fig.17).

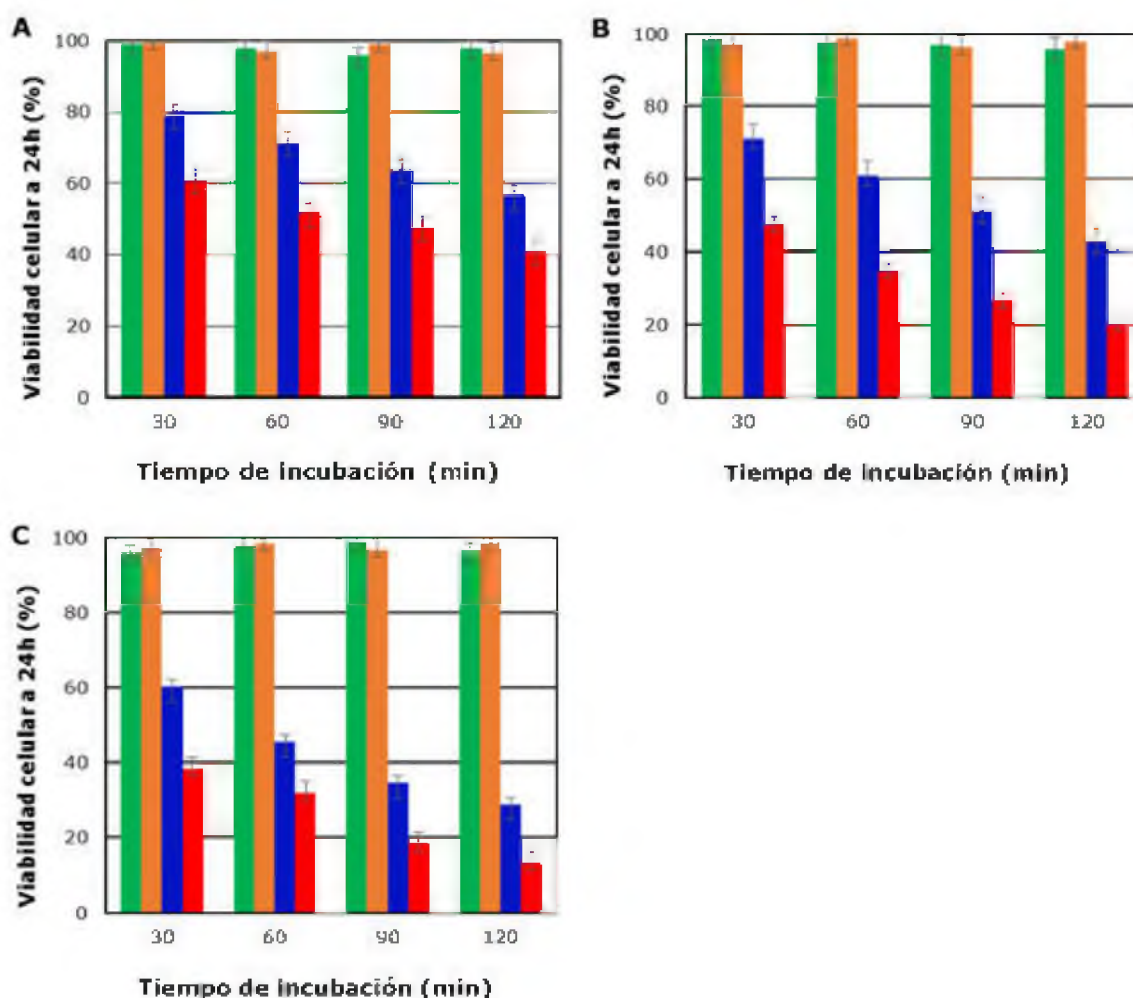


Figura 17. Efecto citotóxico *in vitro* de las micelas de GM₁/Doxo (■) y GM₁-espermidina/Doxo (■) sobre células Hep-2 después de 30, 60, 90 y 120 min de incubación. **A:** [Doxo]_{efec.} de 10 µg.mL⁻¹; **B:** [Doxo]_{efec.} de 25 µg.mL⁻¹; **C:** [Doxo]_{efec.} de 50 µg.mL⁻¹. Controles: Espermidina (■) y GM₁-espermidina (■). Las barras de error indica la DS de la media (n=5)

Varios informes describen que el sistema de captación de poliaminas (PTS) es

un proceso dependiente de energía que involucra un sistema de difusión mediado por un transportador saturable [108,115,116]. Considerando este antecedente, se evaluó si la micela de GM₁-espermidina utiliza algún sistema de captación activo, que pueda ser saturado por pre-incubación de las monocapas con el ligando correspondiente. Además, se evaluó la dependencia del proceso de captación con la temperatura, para lo cual se realizaron los ensayos a 4 y 37 °C. Para determinar la participación del PTS u otro sistema mediado por receptores, se pre-saturaron las monocapas de células Hep-2 con espermidina, GM₁-espermidina o GM₁ antes del contacto con las micelas de GM₁-espermidina/Doxo. Los resultados mostraron que la saturación previa durante 60 minutos no modificó el efecto citotóxico celular del fármaco respecto del mismo sobre células sin tratamiento previo (fig. 18), por lo que no podemos confirmar la participación de un mecanismo de captación de espermidina saturable en el efecto.

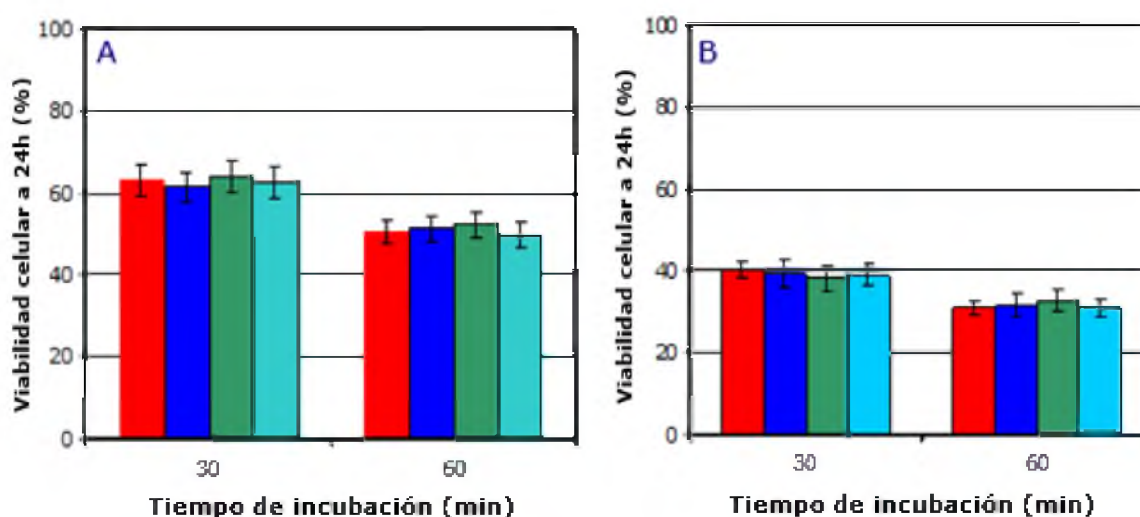


Figura 18: Efecto citotóxico *in vitro* de las micelas GM₁-espermidina/Doxo después de 30 y 60 min, sobre células Hep-2 pre-tratadas durante 60 min con 10 µg.mL⁻¹ de espermidina, micelas de GM₁-espermidina y GM₁ antes de la incubación. **A:** 10 µg.mL⁻¹ de Doxo y **B:** 50 µg.mL⁻¹ de Doxo. Pretratamiento: medio MEM como control (■), GM1 (■), espermidina (■) y micelas espermidina-GM₁ (■). Las barras de error indican la DS de la media (n = 5)

La fig. 19 muestra la viabilidad de las células Hep-2 en las dos condiciones de temperatura evaluadas, después de la incubación con GM₁-espermidina/Doxo a tiempos de 30, 60, 90 y 120 min y concentraciones de Doxo de 10 y 50 mg.mL⁻¹. Las curvas de citotoxicidad obtenidas no muestran diferencias significativas en la actividad, lo que sugiere que la captación de las micelas GM₁-espermidina/Doxo no estaría mediado por un sistema de captación de poliaminas activo.

Los ensayos realizados con Ptx mostraron resultados similares a los descritos para Doxo.

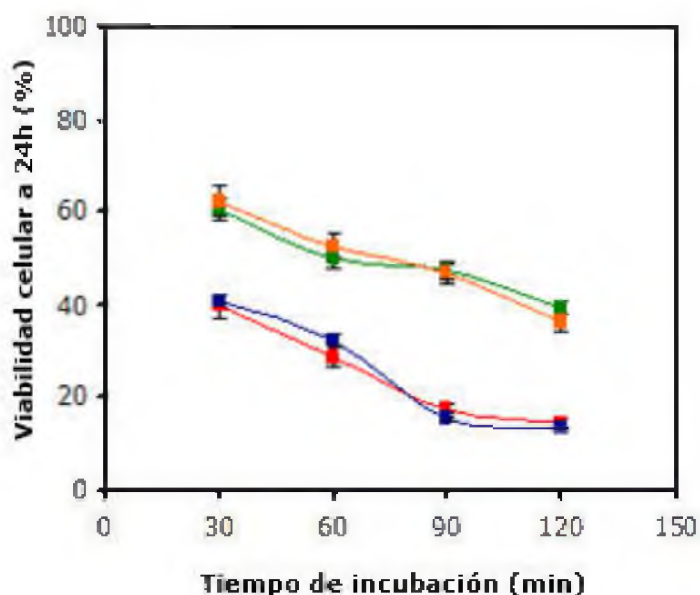


Figura 19: Efecto citotóxico *in vitro* de las micelas GM₁-espermidina/Doxo después de 30, 60, 90 y 120 min de incubación sobre células Hep-2, en dos condiciones de temperatura y concentración: 10 mg.mL⁻¹ a 37°C (■), 10 mg.mL⁻¹ a 4°C (■), 50 mg.mL⁻¹ a 37°C (■) y 50 mg.mL⁻¹ a 4°C (■). Las barras de error indican la DS de la media (n = 5)

4.5 Discusión

El uso de poliaminas para el suministro de agentes citotóxicos e incluso genes, debido a su condición natural de acomplejante del ADN [122-129], se presenta como una opción prometedora para mejorar los tratamientos oncológicos actuales. Numerosos informes han descrito una mayor eficacia de compuestos conjugados con poliaminas; sin embargo, ninguno de ellos hace referencia a la unión de espermidina a nanotransportadores o vehículos terapéuticos. El objetivo de este estudio fue determinar si la unión covalente de espermidina a la superficie de micelas de GM₁ mejora la absorción de agentes antitumorales.

Los resultados muestran que la espermidina se une aproximadamente al 25-30% de los gangliósidos que forman la micela. Esta limitada incorporación de la espermidina podría atribuirse a un impedimento estérico en la superficie externa de la micela. Por otra parte, estos datos se correlacionan con los valores de potencial zeta hallados, que muestran una marcada disminución de la

electronegatividad de la superficie micelar, de -7,35 en las micelas de GM₁ a -0,14 mV en las micelas de GM₁-espermidina. Este cambio en la carga neta micelar después de la unión de la espermidina, determina la autoagregación de las micelas en medios de baja fuerza iónica, producido por la presencia simultánea de cargas positivas y negativas en la superficie micelar que interactúan electrostáticamente. Este efecto es revertido por la adición de 100mM de NaCl.

El análisis del tamaño de las micelas por TEM muestra una leve pero no significativa diferencia entre las micelas de GM₁ y GM₁-espermidina. Del mismo modo, los estudios de DLS mostraron resultados similares para ambas micelas, sin embargo, el índice de polidispersidad revela una población más homogénea de las micelas de GM₁-espermidina. Por último, la cromatografía de exclusión por tamaño muestra un evidente cambio en los perfiles de elución de las micelas de GM₁-espermidina, lo que indica un tamaño más pequeño de estas micelas en relación a las de GM₁. En este punto, es importante señalar que el fundamento de la medición de cada uno de estos métodos es completamente diferente, lo que podría explicar el cambio encontrado entre ambas mediciones, el resultado obtenido por SEC podría ser atribuido a un retraso en el paso de las micelas de GM₁-espermidina debido a una mayor interacción con la resina de la columna como resultado del cambio en la carga neta superficial de las nanoestructuras. Además, debe señalarse que el tamaño de estas estructuras se encuentra en el límite de detección de DLS.

La capacidad de las micelas de GM₁ modificadas con espermidina para cargar fármacos no mostró diferencias significativas con respecto a las micelas de GM₁, la carga de Ptx o Doxo fue similar en ambas micelas. Los resultados demuestran que la conjugación de la espermidina no afecta la capacidad de las micelas de GM₁ para cargar fármacos oncológicos ni la estabilidad de los complejos de GM₁-espermidina/fármaco en solución.

Por último, el efecto de la Doxo cargada en micelas GM₁-espermidina respecto a la droga cargada en micelas sin modificar muestra diferencias cinéticas acotadas a un rango estrecho de concentración y tiempo de incubación.

4.6 Conclusión

Los resultados obtenidos correlacionan con los reportados por otros autores en relación a diferentes fármacos conjugados con espermidina [130-132]. La conjugación de espermidina a un vehículo terapéutico se comporta de manera similar a la espermidina conjugada a fármacos, como se describe en numerosas publicaciones [118,119,130-132]. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron evidencias que involucren la participación del sistema de transporte específico de poliaminas en la absorción de las micelas modificadas. La diferencia cinética observada puede ser atribuida a distintas razones, que incluyen la unión a sitios aniónicos presentes en la superficie celular o a mecanismos no específicos como la pinocitosis. En resumen, las micelas de GM₁ modificadas con espermidina y las micelas sin modificar muestran propiedades físicas y biológicas similares que nos permiten considerar a las mismas como una alternativa interesante a seguir evaluando en la búsqueda de sistemas de administración de fármacos más eficientes.

5. CAPÍTULO 2

Incorporación de anticuerpos en la superficie de micelas de GM₁

5.1 Resumen

En este capítulo se presentan resultados referidos a la incorporación de anticuerpos (IgG) en las micelas de GM₁ con el objetivo de combinar las propiedades de ambos en un único sistema. Se describe la influencia del anticuerpo sobre el tamaño y distribución de la población micelar, la morfología, la eficiencia de encapsulación de fármacos, así como el efecto citotóxico de los complejos formados.

Los resultados demuestran que es posible incorporar anticuerpos en la estructura micelar variando condiciones como el pH y la temperatura, lo que permite obtener complejos GM₁-IgG que se mantienen unidos, principalmente, por interacciones de naturaleza hidrofóbicas. Los estudios revelan que utilizando condiciones de temperatura, que condicionan la estructura micelar, y de pH, que afecta principalmente la estructura de la IgG, se logra obtener complejos estables hasta una relación GM₁/IgG 4/1 (p/p).

Los resultados de DLS y TEM muestran un tamaño significativamente más grande de los complejos GM₁-IgG respecto a las micelas de GM₁, que se relaciona de forma directa con la cantidad de IgG cargada. Además, se observa que los complejos GM₁-IgG son capaces de encapsular fármacos como Ptx o Doxo, y que se debe seguir un orden adecuado durante la preparación, para obtener complejos ternarios GM₁-IgG/fármaco eficientes.

Por otra parte, se demuestra que los anticuerpos mantienen sus propiedades de reconocimiento antigénico después de la incorporación, y que no son desplazados de la micela por otras proteínas plasmáticas como la Alb, una proteína que ya demostramos previamente que se une eficazmente en las micelas de GM₁.

Por último, si bien los ensayos con células tumorales *in vitro* no revelan diferencias significativas en el efecto citotóxico de los complejos GM₁-

IgG/fármaco respecto a GM₁/fármaco, el modelo constituye apenas una primera herramienta en lo que se refiere a la actividad biológica, con diferencias sustanciales en relación a un sistema *in vivo*, donde ya el hecho de que la actividad del fármaco se mantenga y el vehículo no muestre mayor toxicidad, constituyen dos eventos indispensables para cualquier sistema en evaluación. Otra posibilidad del sistema, es la opción que ofrece el modelo GM₁-IgG/fármaco como un sistema dual o multifuncional, en el cual se puede combinar la acción del anticuerpo con el del fármaco transportado dentro de la micela.

5.2 Introducción

Las inmunoglobulinas (IgG) o anticuerpos son un grupo de glicoproteínas que constituyen uno de los mecanismos de defensa del organismo más importantes en los animales vertebrados. Presentan una estructura muy similar en forma Y (fig. 20) de moléculas bifuncionales con dos dominios idénticos para el reconocimiento de antígenos (fragmento F_{ab}), y dos dominios idénticos (fragmento F_c) con función efectora (fijación del complemento, receptores celulares, etc.). La región de unión al antígeno es altamente específica y varía entre los anticuerpos. Existen miles de millones de anticuerpos diferentes, cada uno de ellos con una especificidad distinta [72].

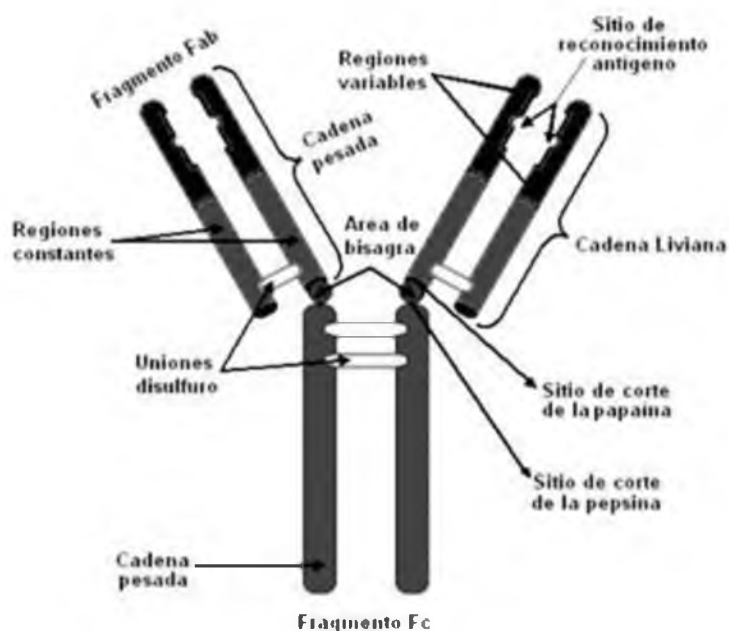


Figura 20: Estructura de un anticuerpo típico. Molécula de IgG formada por dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas unidas por puentes de disulfuro. Los productos resultantes de la acción de las enzimas (papaína y pepsina) dan los Fragmentos F_c y F_{ab}.

Desde Paul Ehrlich, el primero en teorizar el uso de una "bala mágica" para dirigir fármacos dentro del cuerpo [133], idea que consistía en unir el fármaco a una entidad (anticuerpo) capaz de reconocer selectivamente el agente patológico (células, bacterias u otros microorganismos) y destruirlo, se identificó a los anticuerpos como las principales moléculas para dirigir, debido, precisamente, a su alta afinidad y especificidad contra antígenos objetivos. Desde entonces, esa idea ha ido evolucionando y se han propuesto diferentes técnicas de direccionamiento. Paralelamente, se han desarrollado distintos tipos de vehículos, de acuerdo con la información sobre toxicidad, tolerabilidad, biocompatibilidad y aceptabilidad de los materiales utilizados por los organismos vivos.

Hoy en día una estrategia habitual diseñada para alcanzar un alto grado de selectividad y mejorar la captación de fármacos en determinadas células, es unir un anticuerpo a un vehículo o sistema transportador [134,37,54,49,59]. Estos sistemas están compuestos de: la sustancia farmacológicamente activa, el vehículo utilizado para aumentar el número de moléculas activas dirigidas (frecuentemente un nanotransportador) y el anticuerpo contra un blanco específico, capaz de conducir todo el sistema al sitio de acción seleccionado. Estos sistemas combinan las propiedades propias de los nanotransportadores con la especificidad y selectividad de los anticuerpos. Hasta la fecha, más de 30 anticuerpos monoclonales (mAb) se han aprobado para su uso clínico, incluyendo trastuzumab anti-Her2 (Herceptin®), bevacizumab, rituximab anti-CD20 (Rituxan®) y cetuximab y alrededor de 150 están en diferentes fases de ensayos clínicos (www.fda.gov/). La mayoría hasta ahora de los aprobados están dirigidos contra diferentes procesos tumorales y pueden ser humanizados, quiméricos y murinos [72].

Se han descrito numerosos procedimientos para unir anticuerpos a sistemas transportadores de fármacos para una orientación activa, los que incluyen métodos covalentes y no covalentes [63-65,135-141]. En todos los casos, el principal objetivo es unir el anticuerpo al transportador sin que pierda su funcionalidad después de la unión. Los métodos más comunes empleados son a través de la conjugación química mediante el uso de agentes ligantes. La conjugación covalente da lugar a una unión más estable, lo que podría mejorar la estabilidad físico-química y el tiempo de permanencia "in vivo" del sistema, como así también, prevenir el desplazamiento competitivo del anticuerpo por

componentes sanguíneos [63-65]. Sin embargo, la unión covalente a menudo altera las funciones biológicas de los anticuerpos, así como de las nanoestructuras transportadoras de los fármacos. Estos inconvenientes han limitado en gran medida su aplicabilidad clínica.

Los procedimientos de unión no covalentes, por asociación física, suelen ser más simples y fácil de realizar, no obstante, hay una serie de factores que deben considerarse debido a que son uniones menos estables, lo cual frecuentemente ocasionan la desorción o el desplazamiento de los anticuerpos por proteínas plasmáticas que compiten por los sitios de unión [135,136,66]. Además, la correcta orientación de los anticuerpos en la nanoestructura es otro factor clave que puede reducir o incluso eliminar la eficacia del reconocimiento con su molécula diana. Por todo esto, dependiendo de la técnica elegida, es importante optimizar las condiciones y caracterizar los complejos obtenidos en términos de sus propiedades fisicoquímicas y también con respecto a su actividad biológica.

En este contexto, evaluamos la incorporación de anticuerpos específicos a las micelas de GM₁, con el objeto de lograr un sistema de administración de fármacos con orientación específica. En trabajos previos se demostró que estas micelas interactúan con Alb a través de interacciones hidrofóbicas, sin perder su capacidad para cargar fármacos. Esta interacción es regulada por condiciones tales como el pH y la temperatura [106]. Esta primera evidencia de que las micelas de GM₁ pueden interactuar e incorporar una proteína en su estructura fue lo que nos impulsó a evaluar la incorporación de anticuerpos a la micela.

Empleamos una estrategia de unión no covalente y evaluamos la influencia de diferentes factores fisicoquímicos para optimizar la cantidad de anticuerpos unidos a las micelas preformadas. Además, describimos las propiedades fisicoquímicas, estructurales y de reconocimiento con el objetivo de caracterizar los complejos obtenidos y analizamos la posibilidad de lograr la focalización y la captación de estos vehículos por células que expresan los correspondientes antígenos específicos.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Materiales

5.3.1.1 Reactivos

- Las soluciones madre de GM₁ se prepararon disolviendo GM₁ porcino, suministrado por TRB Pharma S.A. en agua bidestilada a una concentración final de 250 mg.ml⁻¹. Después de 24 h a 4-8°C, se centrifugaron durante 15 min a 50.000g y el sobrenadante se filtró a través de 0,22 micras.
- Los anticuerpos IgG humanos totales fueron proporcionados por el Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba (Córdoba, Argentina).
- Los anticuerpos IgG anti-Rub provienen del Kit para el Test IMMULITE 2000: inmunoensayo quimioluminiscente cuantitativo de dos pasos en fase sólida, para uso en diagnostico *in vitro* en el analizador Inmulite/Inmulite 1000.
- Los anticuerpos IgG anti-HBs provienen del Kit para el Test ELECSYS Anti-HBs: inmunoensayo quimioluminiscente tipo sándwich contra el antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) ROCHE, para uso en el analizador de inmunoensayo Elecsys Roche.
- Anticuerpos monoclonales CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5 (OptiClone), Immunotech, Beckman, Francia.
- Anticuerpos monoclonales IgG primarios anti-HER-2/neu (anticuerpo dirigido contra el receptor para el factor de crecimiento de tipo epidérmico humano y el anti-Ki-67 de conejo (anticuerpo dirigido contra la porción C-terminal del antígeno nuclear Ki-67), Ventana Medical Systems, Inc., EEUU.
- Anticuerpos primarios IgG anti-RF (anticuerpo dirigido contra el receptor para folatos), IgG anti-RLDL (anticuerpo dirigido contra el receptor para las lipoproteínas de baja densidad LDL) y IgG anti-CD44 (anticuerpo dirigido contra el receptor para el ácido hialurónico), de SigmaAldrich.
- El Ptx es de Yunnan Smandbet Co. Ltd. (Kumming, China). Las soluciones madre de Ptx se prepararon disolviendo el fármaco en DMSO a una concentración final de 50 mg.ml⁻¹.
- La Doxo fue provista por NANOX S.A. (Buenos Aires, Argentina). Las soluciones madres se prepararon en solución fisiológica a una concentración de 6 mg.ml⁻¹.

- Las columnas de Sephadex G-25 y G-200 fueron compradas en GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).
- Todos los demás reactivos de grado analítico se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania) y se usaron como se recibieron.
- Medios de cultivo MEM (medio esencial mínimo) y DMEM (medio esencial mínimo Dulbecco) suplementado con suero fetal bovino irradiado (NATOCOR, Córdoba, Argentina) al 1 o al 10 % (v/v) según condiciones de mantenimiento o de crecimiento respectivamente.

5.3.1.2 Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: células de mono verde africano (VERO), células humanas de epiteloma laríngeo (Hep-2), células humanas de epiteloma de cuello de útero (HeLa), células de carcinoma de pulmón humano de células no pequeñas (H1299) y células de melanoma de ratón altamente metastásicas (B16).

Para los cultivos celulares se utilizó MEM suplementado con suero fetal bovino irradiado (NATOCOR, Córdoba, Argentina) al 1 o al 10 % (v/v) según condiciones de mantenimiento o de crecimiento respectivamente.

5.3.2 Métodos

5.3.2.1 Preparación de micelas de GM₁ con anticuerpos IgG

Las micelas de GM₁ a concentraciones de ensayo, 10 y 20 mg.mL⁻¹, se prepararon diluyendo la solución madre de GM₁ en agua bidestilada y filtrando 24 h antes de su uso.

Los anticuerpos IgG humanos totales se agregaron lentamente y con agitación suave a las soluciones de GM₁, previamente ajustadas a las condiciones de cada ensayo.

La influencia de la temperatura sobre la interacción entre las micelas de GM₁ y las IgG, se evaluó incubando soluciones de GM₁ de 20 mg.ml⁻¹, a diferentes temperaturas: 4, 25, 37 y 45 y 55°C durante 60 min. Pasado ese tiempo, se agregaron 5 mg.ml⁻¹ de anticuerpos IgG totales a cada solución y se mantuvo cada mezcla a la misma condición seleccionada inicialmente durante 60 min más.

Luego, las muestras se refrigeraron y conservaron a 4°C antes de ser evaluadas mediante estudios cromatográficos.

Para evaluar el efecto del pH, soluciones de 20 mg.ml⁻¹ de GM₁ fueron llevadas a pH 3; 4,5 y 7,4 usando buffers Glicina-HCl, Acetato de sodio y Fosfato de sodio respectivamente, a una concentración de 100 mM. Posteriormente, cada solución se la incubó con 10 mg.ml⁻¹ de IgG totales por 24 h a la misma condición de pH. Por último, las muestras se refrigeraron y conservaron a 4°C antes de ser evaluadas por análisis cromatográficos.

Para evaluar el efecto del tiempo de incubación, soluciones de 20 mg.ml⁻¹ GM₁ se incubaron con 10 mg.mL⁻¹ de IgG totales a distintos tiempos: 10,30, 60, 90 y 120 minutos a pH 4,5 y 45°C. A continuación, las mezclas fueron refrigeradas a 4°C y se revirtió el pH a 7,4 para ser inmediatamente evaluadas mediante análisis cromatográficos.

5.3.2.2 Caracterización de los complejos GM₁-IgG

5.3.2.2.1 Análisis cromatográficos

Los complejos formados entre GM₁-IgG, según la condición evaluada, fueron separados y cuantificados por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, siglas en inglés). Las muestras y los controles se analizaron utilizando un Akta Explorer 100 (GE Healthcare) equipado con una columna Superdex G-200, previamente equilibrada con buffer fosfato 50 mM (pH 7,4) y NaCl 150 mM, a una velocidad de 0,4 ml.min⁻¹.

El perfil de elución fue monitoreado utilizando un detector UV-visible a 227 y 280 nm, y el contenido de IgG unida a las micelas se cuantificó por el método de Lowry [142].

5.3.2.2.2 Análisis por SDS-PAGE nativo

La identificación de los anticuerpos después de ser incorporados en las micelas y eluidos por cromatografía de exclusión por tamaño se analizó por SDS-PAGE y se comparó con un estándar de anticuerpo nativo. Los geles fueron corridos en condiciones nativas (sin 2-mercaptoetanol) utilizando un equipo Mini-

Protean II de BioRad a un voltaje constante de 200 V en buffer Tris/glicina/SDS. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

5.3.2.2.3 Determinación de la concentración de IgG

La concentración de IgG se determinó por Lowry [142] o por absorbancia directa a 280 nm.

5.3.2.2.4 Tamaño y distribución de partículas

El diámetro medio y el IP de los complejos GM₁-IgG se evaluó por DLS usando un analizador de tamaño de partículas Delsa™Nano Submicron (Beckman Coulter Instruments).

Las micelas fueron diluidas con buffer PBS pH 7,4 y filtradas antes de la medición. Los datos se analizaron con el software Delsa™Nano Beckman Coulter (versión 2.2) proporcionado por el fabricante con el método de análisis CONTIN. Todas las mediciones se realizaron por triplicado, para cada uno de tres lotes independientes de micelas.

5.3.2.2.5 Microscopía electrónica

Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1200 EX II a 300000 aumentos para establecer la morfología de las micelas modificadas. Se cargaron 50 µl de cada muestra en una rejilla de carbono, se incubaron por 5 min y luego la rejilla se secó. A continuación, las rejillas se incubaron con 50 µl de una solución de acetato de uranilo al 10 % por 1 min, se secaron y fueron llevadas al microscopio para su observación.

5.3.2.2.6 Determinación de la carga neta superficial de las micelas

El potencial zeta de las micelas de GM₁, de las micelas precalentadas a 55°C y de los complejos GM₁-IgG fue determinado usando un analizador Delsa™Nano zeta potential analyzer (Beckman Coulter Instruments,) a temperatura ambiente. Las muestras se prepararon con buffer PBS (145mM de NaCl) pH 7,4 y se filtraron antes de la medición. El potencial zeta se determinó por triplicado y los

resultados fueron calculados de forma automática por el analizador.

5.3.2.3 Determinación de la eficiencia de los complejos de GM₁-IgG para cargar fármacos

Con el objetivo de determinar si la IgG unida a las micelas de GM₁ afecta su capacidad de carga, incubamos mezclas de GM₁-IgG, en condiciones propicias de interacción, a 10 mg.ml⁻¹ de GM₁ con cantidades crecientes de Ptx o Doxo, para obtener relaciones molares GM₁/fármaco desde 50/1 a 1/1. La carga de los fármacos se realizó a 20°C durante 30 min antes de incubar las muestras a 4°C durante 24 h. Pasado ese tiempo, las muestras fueron dializadas contra buffer PBS pH 7,4 a 4°C durante 24h o eluídas a través de una columna de exclusión por tamaño para separar el fármaco no incorporado. También se analizó la influencia del orden de carga del fármaco y la IgG. El fármaco incorporado fue cuantificado según se describió en el capítulo 1.

5.3.2.4 Reconocimiento antigénico de los anticuerpos unidos a las micelas de GM₁

Para evaluar la funcionalidad de los distintos anticuerpos incorporados en la estructura micelar se utilizaron los siguientes métodos:

5.3.2.4.1 Citometría de flujo

Se utilizaron micelas sobre las cuales se absorbió una combinación de tres anticuerpos monoclonales fluorescentes anti-(CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5) (OptiClone), luego fueron eluídas a través de una columna de exclusión por tamaño (Sephadex G-200) y se incubó con una muestra de sangre entera. Al cabo de la incubación, los glóbulos rojos fueron lisados utilizando un procedimiento sin lavado y a continuación la muestra procesada fue introducida directamente en el citómetro de flujo para su análisis.

Tras la excitación a 488 nm, cada marcador fluorescente emite luz a diferentes longitudes de onda, lo que hace posible el estudio simultáneo de los antígenos CD4, CD8 y CD3, respectivamente. El uso de diagramas de dispersión (representación de la dispersión lateral vs. dispersión frontal) permite la

discriminación de los linfocitos de los desechos, monocitos y células polimorfonucleares.

Como controles, se analizaron anticuerpos libres y micelas no recubiertas.

5.3.2.4.2 Inmunoensayo quimioluminiscente

Se llevó a cabo un inmunoensayo quimioluminiscente de dos pasos en fase sólida (IMMULITE 2000), utilizado para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG anti Rubeola en diagnostico *in vitro*, para fin de evaluar la funcionalidad de anticuerpos IgG anti-Rub absorbidos en las micelas de GM₁.

En primer lugar, los anticuerpos IgG anti-Rub fueron unidos con las micelas en condiciones experimentales favorables. A continuación, las muestras fueron eluídas a través de una columna Superdex G-200 para separar los anticuerpos libres. Finalmente, se midió y se comparó su actividad biológica con anticuerpos IgG anti-Rub estándar.

Del mismo modo, anticuerpos IgG anti-HBs fueron absorbidos en las micelas de GM₁ y eluídas a través de una columna de exclusión por tamaño para separar los anticuerpos libres. Posteriormente se midió y se comparó su actividad biológica con anticuerpos IgG anti-HBs estándar mediante un inmunoensayo quimioluminiscente tipo sándwich contra el antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg).

5.3.2.4.3 Inmunohistoquímica

Anticuerpos monoclonales primarios IgG anti-HER-2/neu humano y anti-Ki-67 de conejo fueron absorbidos en las micelas de GM₁ bajo condiciones experimentales preestablecidas y a continuación fueron incubados con secciones de tejidos tumorales, que expresan el antígeno específico, fijados en formol durante 16 a 32 min. Finalmente, los tejidos con las muestras se tiñeron sobre un portaobjetos, con el kit de detección provisto por Ventana®.

La capacidad de los anticuerpos de reconocer su antígeno específico luego de ser absorbidos en las micelas fue comparada con la de los mismos anticuerpos libres mediante imágenes obtenidas por microscopía óptica de cortes de tejidos consecutivos.

5.3.2.5 Evaluación de la expresión de receptores específicos en células *in vitro* e interacción con GM₁-IgG anti-Receptor

Se utilizaron distintos anticuerpos como IgG anti-RF, anti-CD44, anti-HER-2/neu y anti-RLDL para evaluar la expresión superficial de receptores específicos en las diferentes líneas celulares antes mencionadas.

Monocapas confluentes fueron incubadas con los distintos anticuerpos anti-Receptor, a concentraciones entre 1 y 20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ durante 4 a 24 h a 37 °C.

En paralelo, las células se incubaron con los mismos anticuerpos adsorbidos en las micelas de GM₁ para evaluar la interacción específica de GM₁-IgG anti-Receptor con las células.

Después de la incubación, las células fueron lavadas exhaustivamente con PBS para remover el material que no haya reaccionado y se adicionó un anticuerpo secundario anti-IgG marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) o con la enzima peroxidasa, a diferentes diluciones durante 2 h a 37°C. Por último, se lavó nuevamente las monocapas para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado y el material unido fue analizado por microscopía de fluorescencia o colorimétrica.

La evaluación final colorimétrica se realizó después de la adición de un substrato específico (cromógeno), la Ortofenilendiamina (OPD) sobre el que la enzima marcadora actúa y da un producto de reacción coloreado observable y cuantificable. Las mediciones de absorbancia se realizaron en un lector de placas automatizado (BioRad., CA, EE.UU.) a $\lambda=490\text{nm}$. A la absorbancia de cada muestra se le descontó el blanco de reacción. Se tomó como blanco de reacción, a las monocapas no tratadas a las que se adicionó solamente el anticuerpo secundario marcado y el cromógeno para la reacción. Los resultados representan valores medios de tres mediciones y sus respectivas desviaciones.

5.3.2.6 Citotoxicidad *in vitro* de complejos GM₁-IgG/fármaco

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron utilizando las líneas celulares que exhibieron expresión de receptores específicos (+), como las células de carcinoma de pulmón humano de células no pequeñas (H1299), receptor CD44 (+); células de melanoma de ratón altamente metastásicas (B16), RF y RLDL (+) y células humanas de epiteloma de cuello de útero (HeLa), receptor CD44 (+).

Monocapas confluentes crecidas en placas de 96 pocillos se incubaron con micelas de GM₁/Doxo o GM₁-IgG antiR/Doxo de distinta concentración final de Doxo (10, 25, 50 µg.ml⁻¹), a diferentes tiempos (30 a 480 min). Después de cada tiempo, se reemplazó el medio con la muestra por medio fresco y se incubaron 24 h a 37°C y con un 5 % de CO₂. Luego de las 24 h, las células se lavaron tres veces con PBS, las células remanentes se fijaron con formol al 10% y luego fueron teñidas con una solución de cristal violeta al 0,4% en metanol durante 15 min y cuidadosamente lavadas con agua destilada. Posteriormente se añadió una solución de ácido acético al 5% a las células teñidas para disolver el color y pasados 10-15 min se determinó la absorbancia.

El análisis cuantitativo (evaluación colorimétrica de las células fijadas) se realizó mediante mediciones de absorbancia en un lector de placas automatizado (Bio-Rad., CA, EE.UU.) a 570 nm. Se calculó el % de viabilidad celular y se lo comparó entre muestras. Se tomó como control negativo, 100% de supervivencia celular, a células no tratadas a las que se adicionó solamente medio de cultivo. Los resultados representan valores medios de cinco mediciones y sus respectivas desviaciones. El análisis estadístico se realizó como se mencionó en el capítulo precedente 1.

Los ensayos con Ptx se realizaron de forma similar a los de Doxo pero, a diferencia de esta, las monocapas se incubaron con Ptx, GM₁/Ptx o GM₁-IgG anti R/Ptx durante 24hs.

5.4 Resultados

5.4.1 Caracterización de la interacción GM₁-IgG

En primer lugar, los estudios estuvieron centrados en caracterizar la interacción que se establece entre las micelas de GM₁ con las IgG y determinar qué factores físico-químicos la condicionan, con el fin de optimizar la cantidad de anticuerpos unidos a las micelas preformadas.

Comenzamos analizando el efecto del pH sobre la interacción usando la cromatografía de exclusión por tamaño. En las condiciones del ensayo, las micelas de GM₁ puras (~375 kDa) eluyeron con el volumen V₀ (fracción no-retendida) de la columna y la IgG (150 kDa) eluyó en la fracción correspondiente a un volumen de aproximadamente 6 ml.

Cuando analizamos las micelas incubadas con IgG a pH 7,4, observamos que cada componente conservó su perfil de elución original, indicando que en esa condición no se produce asociación entre ellos. Sin embargo, cuando las micelas fueron incubadas con IgG a pH 4,5, ambos componentes co-eluyen en el V_0 , lo que demuestra claramente una asociación física entre estas dos fracciones. Considerando que las moléculas de IgG son susceptibles a sufrir un desplegamiento o desnaturalización conformacional reversible de su estructura terciaria a pH ácido, que expone al medio parte de sus residuos hidrófobos, principalmente en la región F_c [143,144], los resultados sugieren que ocurre una interacción de tipo hidrofóbica entre ellos. De acuerdo a esto, cuando se incubaron 20 mg.ml^{-1} de GM_1 con 10 mg.ml^{-1} de IgG a pH 4,5 y 25°C , la cantidad de IgG asociada llega a valores de aproximadamente el 75%, mientras que a pH 7,4 solo un 15% de la IgG adicionada interactúa con estas (fig. 21). A valores de pH más bajos (pH 3,6) se observó agregación de las IgG, que no permiten su filtración por las columnas utilizadas.

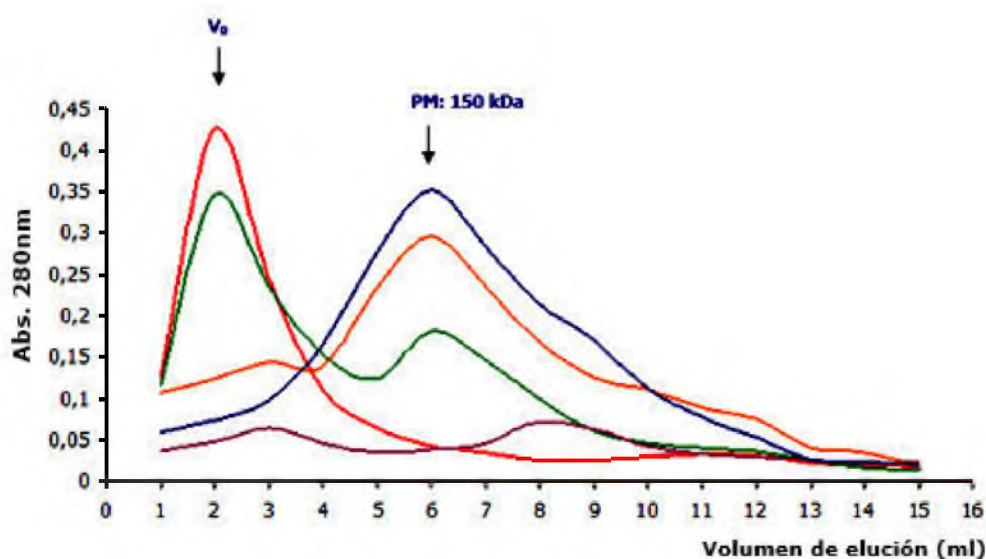


Figura 21: Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM_1 incubadas con IgG a diferentes pH. Cromatografía por Superdex G-200® de IgG (—) y micelas de GM_1 -IgG a: pH 3,6 (—), preparadas a pH 4,5 y eluidas a pH 4,5 (—), preparadas a pH 4,5 y eluidas a pH 7 (—), preparadas y eluidas a pH 7 (—). Micelas de GM_1 20 mg.ml^{-1} con IgG 10 mg.ml^{-1} a 20°C . Micelas de GM_1 eluyen con el volumen V_0 (fracción no retenida) de la columna: dato no mostrado porque el GM_1 no absorbe a 280nm.

Otra variable evaluada fue la influencia de la temperatura sobre la unión de las IgG a las micelas de GM_1 . Del mismo modo, se analizó por cromatografía de exclusión por tamaño y se observó que la interacción se ve favorecida con el incremento de la temperatura de 4°C a 45°C . Los perfiles cromatográficos

obtenidos muestran que la cantidad de IgG unida a las micelas de GM₁ aumenta al aumentar la temperatura de incubación (aumento del pico correspondiente al V₀ de elución) (fig. 22)

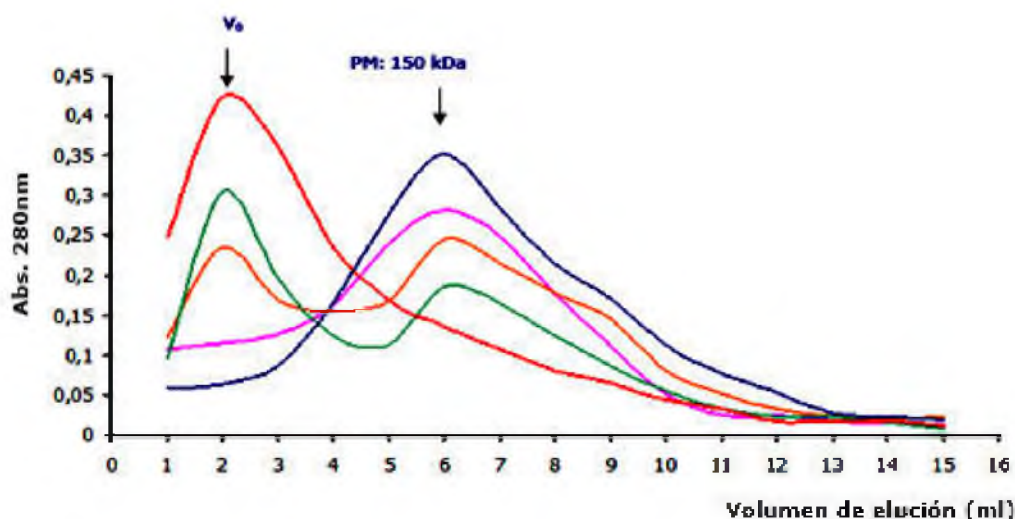


Figura 22: Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM₁ incubadas con IgG a diferentes temperaturas. Cromatografía por Superdex G-200® de IgG (—) y micelas de GM₁-IgG a: 4°C (—), 25°C (—), 37°C (—), 45°C (—). Micelas de GM₁ 20 mg.ml⁻¹ con IgG 5 mg.ml⁻¹.

La incubación a 45°C muestra, además, que la interacción depende del tiempo de incubación de las micelas con la proteína (fig. 23). Se observa que el pico que eluye con el V₀ se incrementa a medida que aumenta el tiempo de incubación (hasta los 90 min.), mientras que ocurre una reducción proporcional del pico de elución correspondiente a la IgG libre.

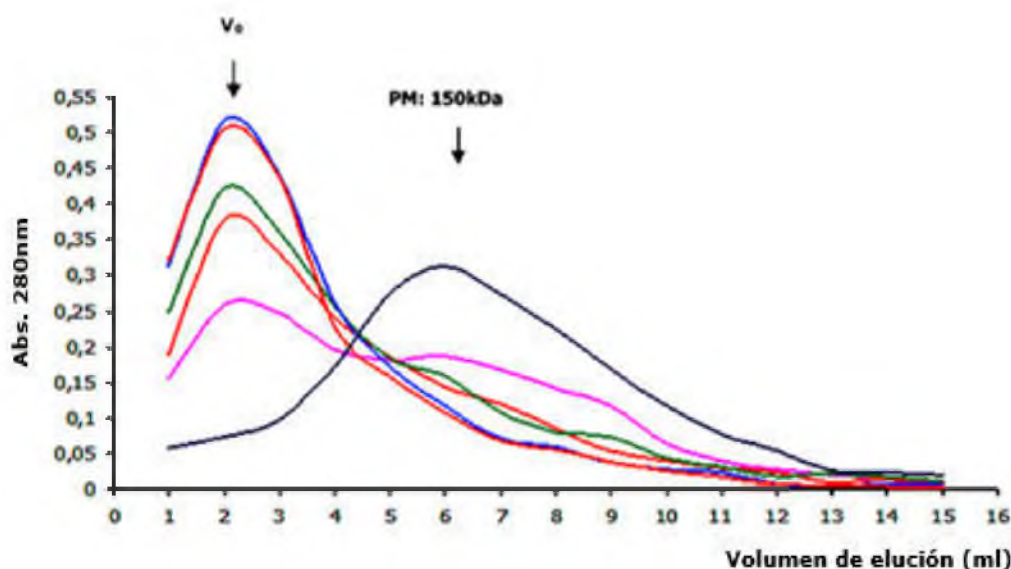


Figura 23: Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM₁ incubadas con IgG a diferentes tiempos. Cromatografía por Superdex G-200® de

IgG (—) y micelas de GM₁-IgG a: 10min (—), 30min (—), 60min (—), 90min (—) y 120min (—). Micelas de GM₁ 20 mg.ml⁻¹ con IgG 5 mg.ml⁻¹ a 45°C.

El análisis no fue realizado a temperaturas superiores debido a que el fragmento F_{ab} de la IgG es sensible al tratamiento térmico y se podría afectar la funcionalidad del anticuerpo. A temperaturas elevadas se incrementa la cantidad de moléculas de IgG parcialmente desplegadas, la velocidad de agregación es tan rápida que las moléculas de IgG se asocian en agregados antes de desnaturalizarse por completo [143,144]. Por otra parte, se conoce que las temperaturas por encima de 55°C inducen la liberación de moléculas de agua unidas a la cadena de oligosacáridos de las micelas de GM₁, lo que determina una reducción significativa de la porción hidrofílica de estas micelas, acompañado a la vez, de una ligera expansión de su región hidrofóbica [145-147].

Teniendo en cuenta los datos anteriores, se evaluó el efecto de pre-calentar las micelas de GM₁ a 55°C y luego estabilizarlas a temperatura ambiente antes de ser incubadas con las IgG a pH 4,5, condición en la cual demostramos que la IgG presenta la mayor capacidad de interacción con el GM₁. Se observó que, en esa condición, las IgG se unen en mayor medida a las micelas, probablemente favorecido por el aumento de hidrofobicidad del sistema (fig. 24). Este resultado, sumado a que la adición de una alta concentración salina (hasta 1M de NaCl) no impide la interacción entre las micelas y las IgG, refuerza el concepto de la naturaleza hidrofóbica de esta unión.

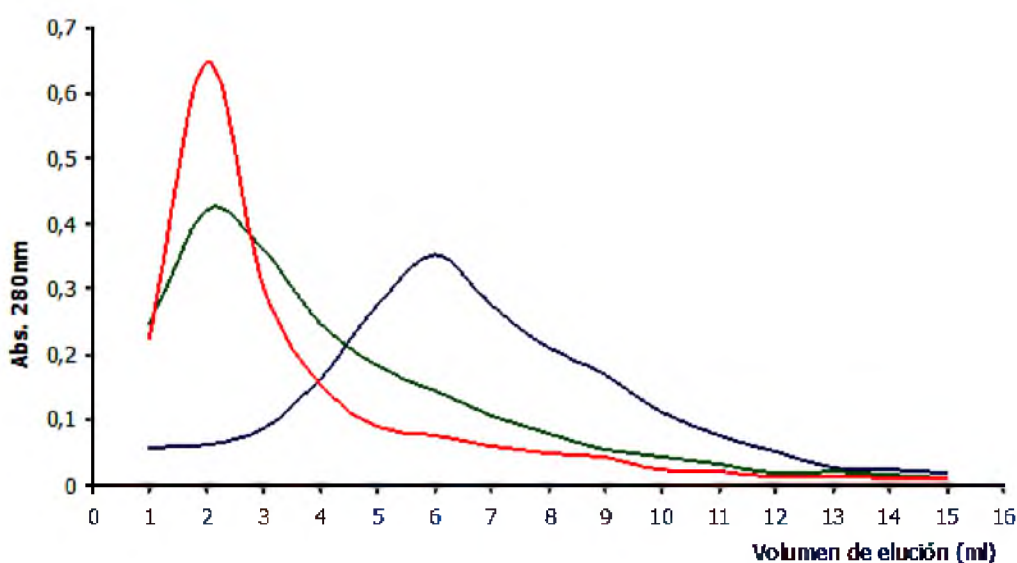


Figura 24: *Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM₁ incubadas con IgG en diferentes condiciones. Cromatografía por Superdex G-200® de IgG (—), micelas de GM₁-IgG a 45°C durante 90min (—) y micelas de GM₁ calentadas a*

55°C, estabilizada a 20°C antes de incubar con IgG a pH 4,5 (—). Micelas de GM₁ 20 mg.ml⁻¹ con IgG 5 mg.ml⁻¹.

Los resultados descriptos indican que la mejor condición para optimizar la unión de IgG a las micelas de GM₁ se consigue cuando las micelas son precalentadas por encima de 55°C y luego estabilizadas a temperatura ambiente antes de ser incubadas con las IgG a pH 4,5. En esa condición, se evaluó la capacidad de carga de las micelas de GM₁. Para esto, se incubaron cantidades crecientes de IgG con una cantidad fija de micelas. Los estudios revelaron que las micelas alcanzan su nivel máximo de saturación en la relación GM₁/IgG de 4/1 (p/p) (fig. 25).

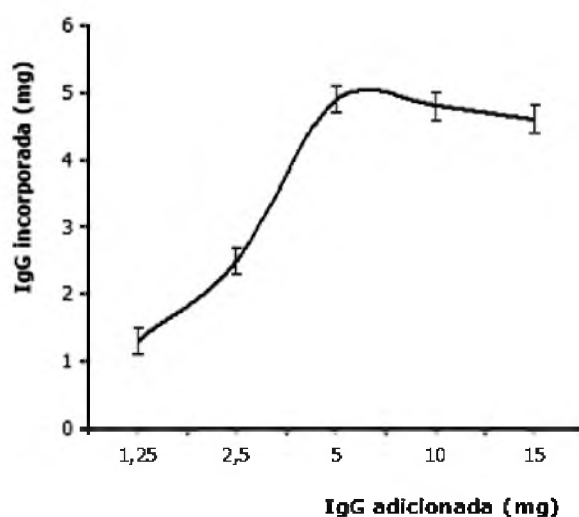


Figura 25: Micelas de GM₁ incubadas con cantidades crecientes de IgG. Condición: Micelas calentadas a 55°C, posterior estabilización a temperatura ambiente (20°C) antes de ser incubadas con la IgG. Las barras de error indica la DS de la media (n=3).

Como se mencionó anteriormente, una desventaja común de utilizar una estrategia no covalente para incorporar anticuerpos a nanotransportadores terapéuticos es que puede ocurrir el desplazamiento competitivo de estos anticuerpos adsorbidos por componentes de la sangre [135,136,66], característica que limita su uso terapéutico. Sumado el hecho de que estudios previos [106] demuestran claramente que las micelas de GM₁ son capaces de interaccionar específicamente con la Alb luego de su incubación con plasma humano, fue necesario evaluar si la presencia de esta proteína principal del plasma (80%) afecta la interacción entre las micelas de GM₁ y las IgG. Los resultados experimentales muestran que en la condición de mayor incorporación de IgG, co-eluyen los tres componentes, observándose un aumento del pico

correspondiente al V_0 de elución, lo que sugiere que las micelas pueden interactuar con ambas proteínas (fig. 26A). Sin embargo, al aumentar la cantidad de Alb, de 2,2 a 8,8 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, se evidencia la aparición creciente de un pico de elución en volúmenes más altos, que se correlaciona con el perfil de elución de la IgG libre. Esto sugiere un desplazamiento competitivo de las IgG absorbidas en las micelas de GM_1 por parte de la Alb (fig. 26B).

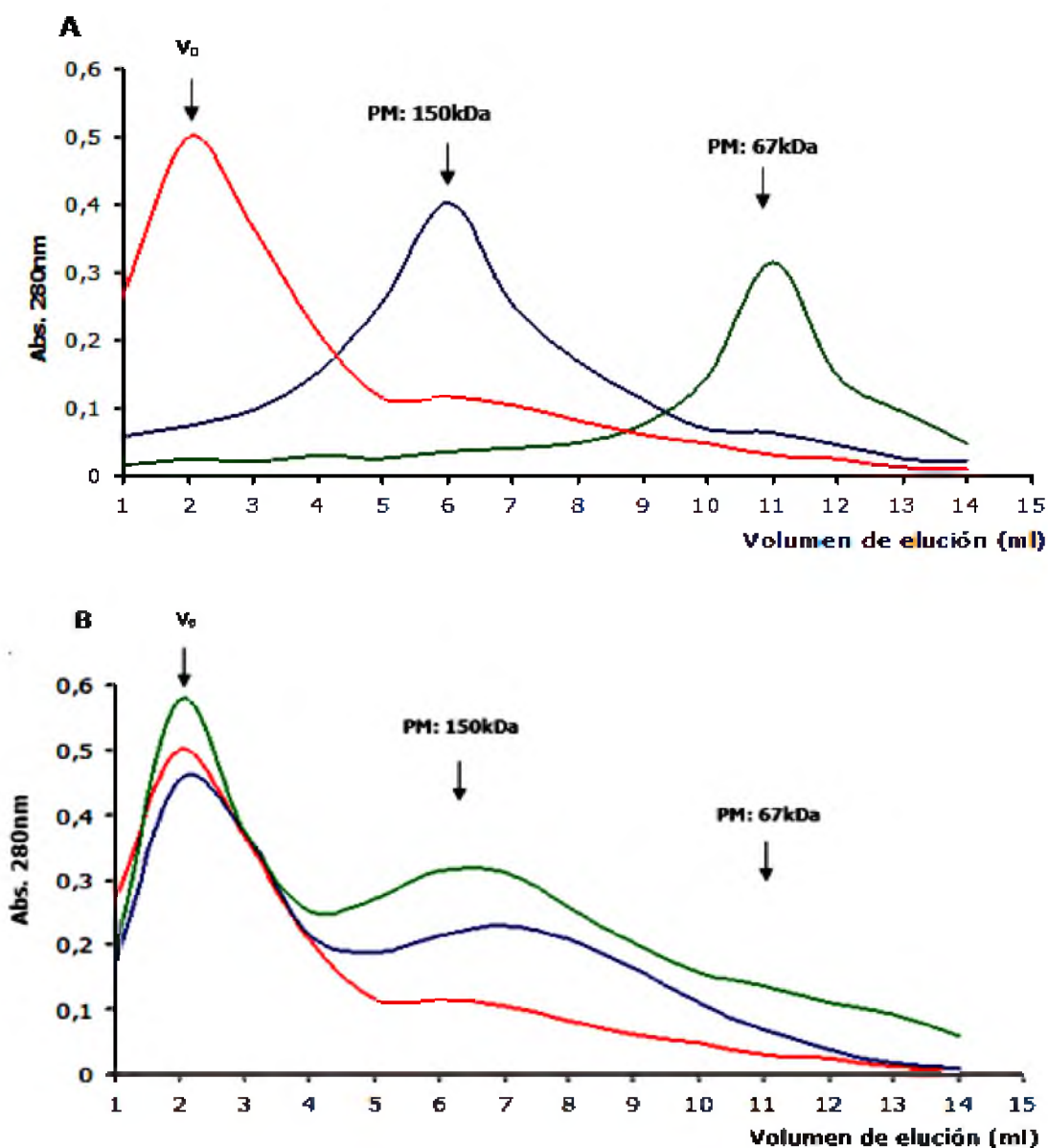


Figura 26: Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM_1 -IgG incubadas con Alb a pH 4,5. **A:** Cromatografía por Superdex G-200® de IgG (—), Alb (—) y micelas de GM_1 -IgG con Alb (—). **B:** Cromatografía por Superdex G-200® de micelas de GM_1 -IgG con diferentes cantidades de Alb. 2,2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Alb (—), 4,4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Alb (—), 8,8 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Alb (—). GM_1 20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ con IgG 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

La fig. 27 muestra el análisis por electroforesis SDS-PAGE nativo de las

fracciones eluídas de la columna de exclusión por tamaño. Con $2,2 \text{ mg.ml}^{-1}$ de Alb adicionada (fig. 27A), se observa la presencia de ambas proteínas en el volumen correspondiente con el volumen V_0 (fracción no retenida) de la columna, mientras que con $4,4 \text{ mg.ml}^{-1}$ (27B) y $8,8 \text{ mg.ml}^{-1}$ (27C), la IgG se desplazó a volúmenes más altos, lo que confirma los resultados anteriores.

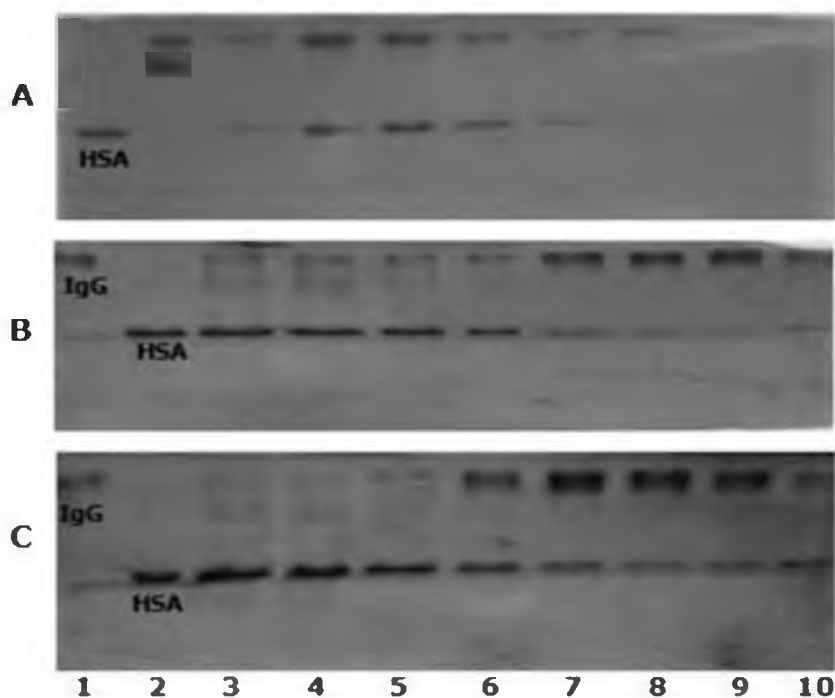


Figura 27: Electroforesis SDS-PAGE (sin 2-mercaptoetanol) de micelas GM_1 -IgG incubadas con diferentes cantidades de albúmina (HSA) a pH 4,5. Los carriles 1-2-para los estándares de IgG y HSA; Carriles 3-10 para las fracciones eluídas de la columna de exclusión de tamaño. A: micelas GM_1 -IgG con $2,2 \text{ mg.ml}^{-1}$ de HSA. B: micelas GM_1 -IgG con $4,4 \text{ mg.ml}^{-1}$ de HSA. C: micelas GM_1 -IgG con $8,8 \text{ mg.ml}^{-1}$ de HSA.

Curiosamente, cuando a los complejos GM_1 -IgG, preparados a pH 4,5, se le ajustó el pH a 7,4 antes de su incubación con la Alb, no se observó desplazamiento de la IgG. En este caso, la IgG co-eluyó con las micelas de GM_1 en el V_0 (fig. 28A), mientras que la Alb eluyó a volúmenes que coinciden con el perfil de la Alb libre, sugiriendo que, cuando se revierte a las condiciones fisiológicas, la IgG se mantiene asociada a las micelas de GM_1 . La fig. 28B por SDS-PAGE nativo de las fracciones eluídas de la columna de exclusión de tamaño, confirma la presencia de la IgG en el V_0 y la elución de la Alb a volúmenes mayores.

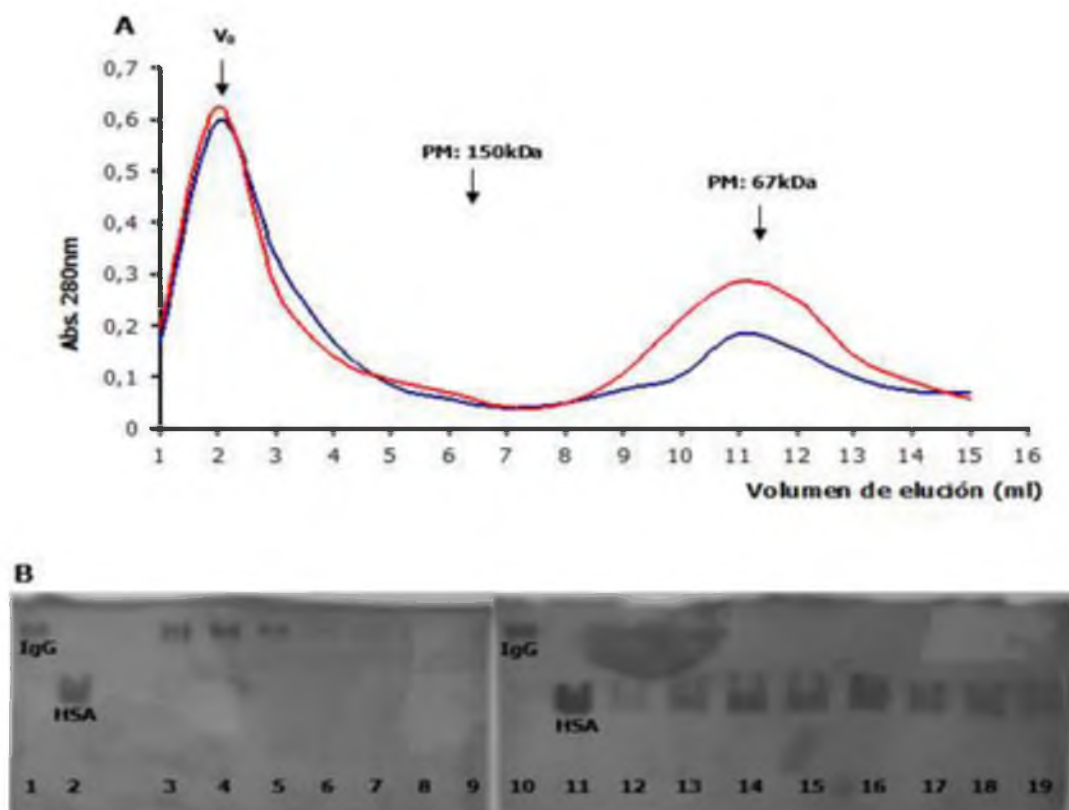


Figura 28. A: Perfil de elución obtenido mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM_1 -IgG incubadas con Albúmina a pH 7,4. Cromatografía por Superdex G-200® de micelas de GM_1 -IgG con diferentes cantidades de Albúmina. 4,4 $mg.ml^{-1}$ de Albúmina (—), 8,8 $mg.ml^{-1}$ de Albúmina (—). **B:** Electroforesis SDS-PAGE (sin 2-mercaptoetanol). Los carriles 1-2-10-11 para los estándares de IgG y HSA (Alb. Humana); Carriles 3-9 y 12-19 para las fracciones eluidas de la columna de exclusión de tamaño.

5.4.2 Caracterización físico-química de los complejos GM_1 -IgG

Se determinaron propiedades físico-químicas de estas micelas como diámetro medio, IP, morfología y potencial zeta. Los resultados de respecto a los mismos valores obtenidos con las micelas de GM_1 se enumeran en la Tabla III. Como se observa, los complejos GM_1 -IgG presentaron un diámetro medio en el rango de 21 a 25 nm, un tamaño significativamente más grande que el de las micelas de GM_1 (11,9 a 14,2nm). Además, se observó que ese aumento de tamaño está directamente relacionado con la cantidad de IgG cargada, lo que señala la presencia de IgG en la estructura micelar.

Por otra parte, la polidispersidad de los complejos GM_1 -IgG analizados (GM_1 -IgG en la relación de 10/1 y 4/1 peso/peso) mostró un índice relativamente alto de $0,28 \pm 0,09$ y $0,28 \pm 0,08$, respectivamente, que no parece estar relacionado con la cantidad de IgG asociada.

Con respecto al potencial zeta, se observaron valores de $-10,6 \pm 0,3$ y $-11,8 \pm 1,2$ para la relación GM₁-IgG de 10/1 y 4/1 p/p, respectivamente, en comparación con $-8,1 \pm 1,0$ para las micelas de GM₁, lo que sugiere que la incorporación de IgG no produce una alteración significativa de la carga neta superficial de la micela. Sin embargo, si se tiene en cuenta que los complejos GM₁-IgG se prepararon a partir de micelas de GM₁ pre-calentadas a 55°C, que tienen un potencial zeta de $-23,6 \pm 1,9$, el resultado muestra que la incorporación de IgG sí indujo una reorganización de la estructura micelar.

Tabla III: Características físico-químicas de las micelas de GM₁ y las micelas de GM₁ modificadas con IgG.

Parámetros	Muestras				
	IgG	GM ₁	GM ₁ (Calentada a 55°C)	10:1 GM ₁ /IgG peso/peso	4:1 GM ₁ /IgG peso/peso
-Diámetro medio (nm)	6,4 ± 2	14,2 ± 3	11,9 ± 2	20,8 ± 2	25,1 ± 2
-Índice de Polidispersidad (PI)	0,16 ± 0,06	0,17 ± 0,08	0,11 ± 0,03	0,28 ± 0,09	0,28 ± 0,08
-Potencial Zeta ζ (mV)	-7,8 ± 1,1	-8,1 ± 1,0	-23,6 ± 1,9	-10,6 ± 0,3	-11,8 ± 1,2

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica mostraron que el tamaño de partícula de las micelas de GM₁ (fig. 29A) fue afectado por la presencia de los anticuerpos, resultando en un aumento del tamaño, estos resultados correlacionan con los obtenidos por DLS. También en este caso se observó una distribución de población no uniforme (fig. 29B).

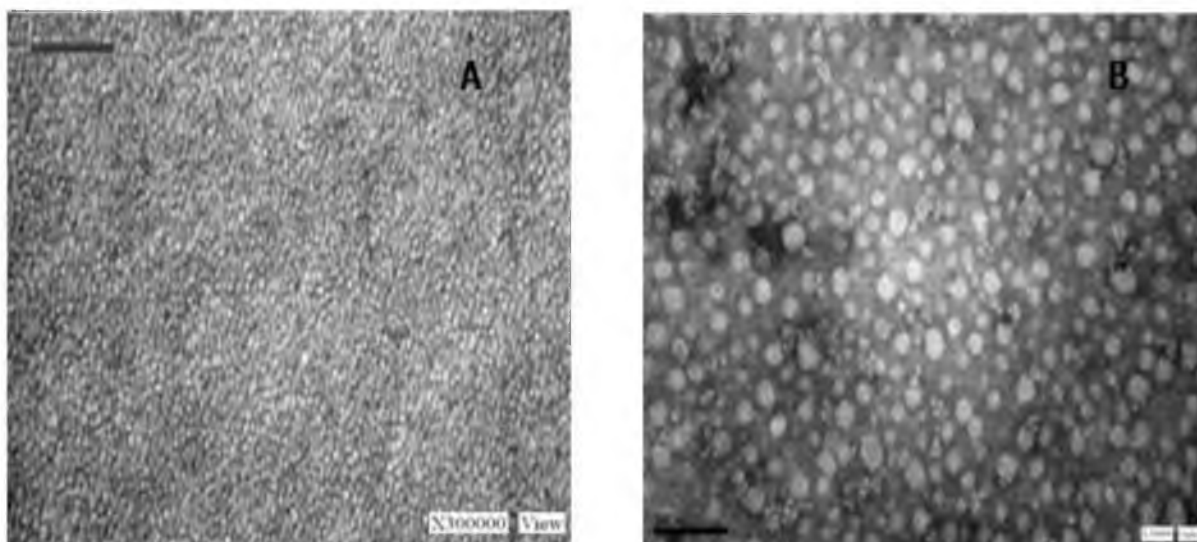


Figura 29: Micrografía electrónica de las micelas de GM_1 calentadas a $55^\circ C$ (A) y las micelas mixtas de GM_1 -IgG (B). X300000. Tamaño barra: 100 nm.

5.4.3 Eficiencia de los complejos GM_1 -IgG en la encapsulación de fármacos

A continuación evaluamos si la presencia de IgG en la estructura micelar afecta la capacidad de la micela para cargar fármacos como Ptx y Doxo. Con Ptx, se observó que la cantidad del fármaco cargado disminuye en función de la cantidad de IgG previamente absorbida en la micela. En la relación GM_1 -IgG de 4/1 (p/p), la máxima cantidad de IgG incorporada en la micela, más del 90% de Ptx permanece insoluble (Tabla IV). Por otra parte, y considerando que se ha demostrado previamente que el Ptx se ubica en el núcleo hidrofóbico de la micela y que otra proteína como la Alb se localiza en sitios más externos y ligeramente accesible al ambiente acuoso externo [80,106], se evaluó la incorporación del Ptx en las micelas de GM_1 antes de la unión con la IgG. Siguiendo este orden de preparación, la eficiencia de encapsulación del Ptx en las micelas GM_1 -IgG fue similar a la descrita anteriormente para las micelas de GM_1 puras (relación molar 5/1 GM_1 /Ptx) [80]. Estos resultados sugieren que la IgG, al igual que la Alb, podría estar localizada en dominios más externos de las micelas de GM_1 , que impiden la posterior entrada del Ptx en la región hidrofóbica de la estructura.

Tabla IV. Incorporación de Ptx en micelas de GM₁ antes de ser incubadas con IgG y con micelas de GM₁ previamente incubadas con IgG, a distintas relaciones de masa GM₁-IgG. Relación molar GM₁/Ptx 5/1.

Relación de masa GM ₁ /IgG (p/p)	Ptx soluble (%)	
	GM ₁ -IgG-Ptx	GM ₁ -Ptx-IgG
15/1	48	98
10/1	42	98
8/1	16	96
4/1	6	99
2/1	3	97

Con Doxo los resultados fueron similares, se observó que la carga del fármaco en las micelas de GM₁ también es afectada por la presencia de IgG. En la relación GM₁-IgG 4/1 (p/p), máxima capacidad de carga de IgG, la cantidad máxima de Doxo en las micelas se redujo de 5/1 a 20/1 (GM₁/Doxo mol/mol).

Por otra parte, y a diferencia de lo que se observó con Ptx, al cargar Doxo en las micelas antes de incubarlo con la IgG, la cantidad de IgG que se unió a las micelas fue dependiente de la cantidad de fármaco precargado. Se observó una relación inversa entre la cantidad de fármaco incorporado y la cantidad de IgG que se une. Así, cuando se aumentó la carga de Doxo desde una relación molar 20/1 a 5/1 (GM₁/Doxo), el porcentaje de IgG unida disminuyó del 100% al 20%, respectivamente.

En conjunto, estos resultados resaltan la importancia de seguir un orden o una secuencia específica en la preparación para obtener sistemas óptimos capaces de incorporar cantidades elevadas de fármacos y anticuerpos.

5.4.4 Actividad biológica de los anticuerpos asociados a la superficie de las micelas

Un aspecto importante a evaluar después de formular el complejo GM₁-IgG o GM₁-IgG/fármaco es determinar la funcionalidad de los anticuerpos incorporados. Para ello, en primer lugar se utilizó una combinación de tres anticuerpos monoclonales fluorescentes: anti-CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5 (OptiClone), que fueron incorporados en las micelas según las condiciones experimentales óptimas

previamente descriptas. Luego, la mezcla se incubó con muestras de sangre entera, después de lo cual se lisaron las células rojas de la sangre y finalmente las muestras procesadas se analizaron por citometría de flujo. Los resultados presentados en la Tabla V revelan que la adsorción de los anticuerpos a las micelas no afecta las propiedades de reconocimiento contra antígenos expresados sobre células en suspensión.

Tabla V. *Análisis por citometría de flujo de micelas GM1 cargadas con una combinación de anticuerpos monoclonales fluorescentes (Opticlone).*

Anticuerpo monoclonal	CD4⁺	CD4⁺	CD8⁺	CD8⁺	CD3⁺	CD3⁺
Muestra	Counts/ mm³	%	Counts/ mm³	%	Counts/ mm³	%
- Control(+): 5ul de la solución estándar de los tres anticuerpos fluorescentes diluidos en Vr: 50ul buffer PBS	2326	56	1039	25	3698	89
- Micelas de GM ₁ (1mg) + 5ul de la solución estándar de los tres anticuerpos fluorescentes diluidos en Vr: 50ul buffer PBS	2410	58	977	23,5	3694	89
- Control (-): Micelas de GM ₁ (1mg) + 5ul de la solución de un anticuerpo (Anti-Rabbit-FITC) diluidos en Vr: 50ul buffer PBS	4	0	3	0	1	0

Luego, se analizó el reconocimiento de antígenos solubles, para lo cual se incorporaron anticuerpos IgG anti-Rub provenientes de un kit comercial contra virus de la rubéola a las micelas de GM₁. Como se muestra en la fig. 10, la absorción de los anticuerpos en las micelas modifica su perfil de elución, ambos componentes co-eluyeron en el V₀, lo que confirma la unión entre estos componentes (fig. 30A). Por otra parte, el análisis por electroforesis SDS-PAGE de las alícuotas recolectadas después de la elución, corrobora la presencia de la IgG en las alícuotas de elución 1, 2 y 3, correspondientes al V₀ de la columna (fig. 30B).

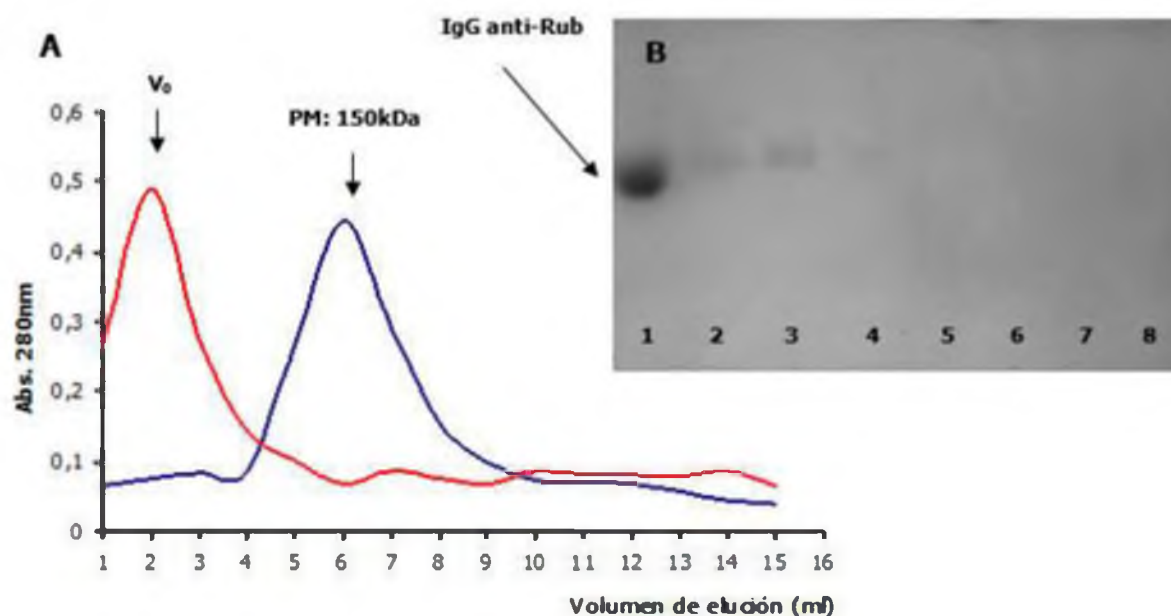


Figura 30: **A-** Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM_1 incubadas con anticuerpos IgG anti-Rub. Cromatografía por Superdex G-200® de IgG anti-Rub (—) y micelas de GM_1 -IgG anti-Rub (—). **B-** Electroforesis SDS-PAGE nativo de las alícuotas de elución 1 al 7 de la muestra GM_1 -IgG anti-Rub (carril 2-8). El carril 1 corresponde el estándar de IgG anti-Rub.

También se evidenció, mediante un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente, que los anticuerpos Anti-Rub conservan su capacidad de reconocimiento específico cuando se los adsorbe a las micelas, incluso contra antígenos solubles (Tabla VI). Además, se observó que el reconocimiento incrementa en relación con la cantidad de anticuerpo absorbido. Para descartar uniones inespecíficas se utilizó anticuerpos IgG totales incorporados a las micelas.

Tabla VI: Prueba IMMULITE 2000 para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG contra el virus de la rubeola. Inmunoensayo quimioluminiscente cuantitativo de dos pasos en fase sólida, para uso en diagnóstico *in vitro*.

MUESTRA	ACTIVIDAD BIOLÓGICA $mIU \cdot ml^{-1}$
- 10ul Anticuerpo IgG anti-Rub diluido en buffer PBS	11.3 ± 4.0
- 10ul Anticuerpo IgG anti-Rub incorporado en 4 mg de micelas de GM_1 diluidos en buffer PBS	11.1 ± 4.2
- 30ul Anticuerpo IgG anti-Rub incorporado en 4 mg de micelas de GM_1 diluidos en buffer PBS	33.3 ± 6.1

Por último, se evaluó la actividad de los anticuerpos IgG anti-Ki67 y anti-Her2/neu absorbidos en las micelas por Inmunohistoquímica (IHC). Después de la incorporación, se incubaron con secciones de tejidos tumorales humanos que expresan el antígeno específico. La visualización del complejo antígeno-anticuerpo se realizó mediante tinción inmunohistoquímica a través de la adición de un fluorocromo o una enzima al anticuerpo. La fig. 31 muestra que los anticuerpos absorbidos mantienen su capacidad de reconocer biomarcadores tumorales tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico o la proteína nuclear conocida como KI-67 en células de cáncer humanos.

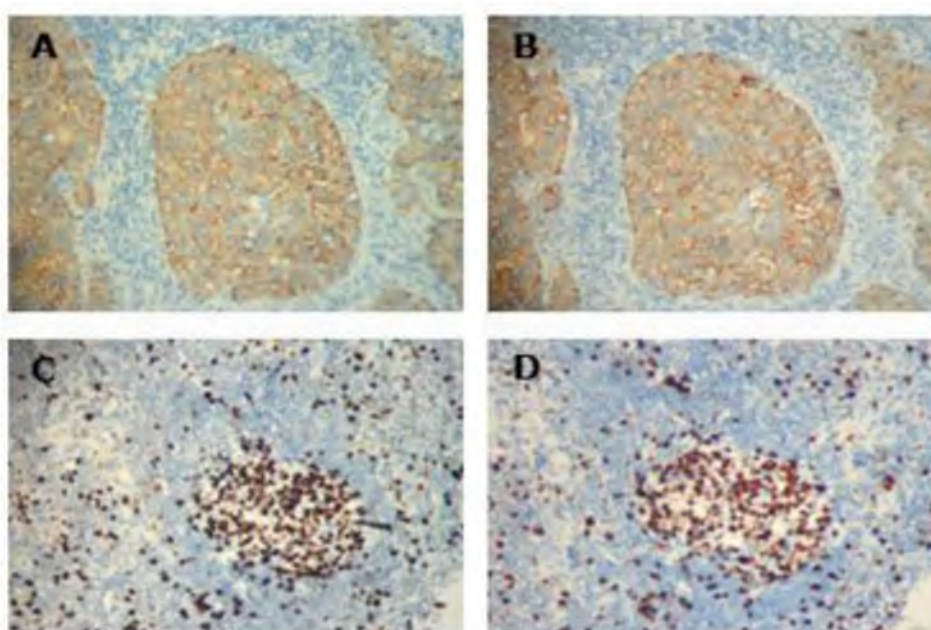


Figura 31: Imágenes de inmunohistoquímica de secciones de tejidos tumorales humanos incubados con: **A-** el anticuerpo monoclonal primario anti-Her2/neu; **B-** las micelas de GM_1 recubiertas con el anticuerpo monoclonal primario anti-Her2/neu, **C-** el anticuerpo monoclonal primario anti-Ki-67 y **D-** las micelas de GM_1 recubiertas con el anticuerpo monoclonal primario anti-Ki-67.

5.4.5 Expresión de receptores superficiales en células *in vitro* e interacción con GM_1 -IgG anti-Receptor

El sistema GM_1 -IgG requiere de la expresión de algún tipo de receptor específico sobre la superficie celular al cual puedan reconocer los anticuerpos unidos a las micelas. Así, utilizamos células H1299, que expresan el receptor CD44 (+); B16, FR y LDLR (+), células Hep-2, LDLR (+) y células HeLa, receptor CD44 y LDLR (+). En general, se observó lecturas de absorbancia crecientes a

mayor concentración de anticuerpo (menor dilución), alcanzando la saturación a partir de concentraciones superiores a $15 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (Tabla VII). Por otra parte, la IgG humana total utilizada como anticuerpo inespecífico de control mostró en todos los casos una débil absorbancia, confirmando la especificidad de la unión.

Tabla VII: Determinación colorimétrica semicuantitativa de la expresión superficial de receptores de superficie en células *in vitro* HeLa, H1299, Hep-2 y B16. FR: receptor de folatos, CD44: receptor de ácido hialurónico y LDLR: receptor de lipoproteínas de baja densidad. Lectura de absorbancia a 490nm. Descontado blanco de reacción

Línea Celular	IgG anti-FR [$\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$]				IgG anti CD-44 [$\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$]				IgG anti LDLR [$\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$]				IgG inespecífico [$\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$]	
	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20	10	20
HeLa	0,12	0,15	0,14	0,22	0,26	0,45	0,43	0,42	0,23	0,29	0,37	0,35	0,1	0,08
H1299	0,13	0,09	0,14	0,11	0,33	0,46	0,49	0,51	0,08	0,12	0,11	0,16	0,09	0,11
B16	0,34	0,53	0,51	0,54	0,13	0,17	0,14	0,17	0,19	0,26	0,36	0,37	0,09	0,13
Hep-2	0,1	0,08	0,13	0,12	0,09	0,11	0,13	0,1	0,36	0,59	0,67	0,71	0,13	0,11

En paralelo, cuando los mismos anticuerpos fueron adsorbidos en las micelas y luego incubados con las células para el reconocimiento específico, los resultados no revelaron diferencias significativas respecto a los anticuerpos solos. Esto demuestra, nuevamente, que la incorporación de los anticuerpos en la estructura micelar no afecta su funcionalidad.

Micelas de GM_1 solas y cargadas con IgG humana total se utilizaron como control para evaluar la unión inespecífica.

5.4.6 Citotoxicidad *in vitro* de los complejos GM_1 -IgG/fármaco

En este punto, se evaluó la citotoxicidad de los complejos GM_1 -IgG/Doxo y GM_1 -IgG/Ptx con el propósito de determinar si los anticuerpos incorporados en las micelas de GM_1 producen algún cambio en la actividad biológica *in vitro* del fármaco. El efecto de Doxo cargada en los complejos GM_1 -IgG anti-CD44 fue evaluado sobre la línea celular H1299, siempre en comparación con el efecto de GM_1 -IgG inespecífico/Doxo y GM_1 /Doxo.

La fig. 22 muestra la viabilidad de las células H1299 después de la incubación con las distintas muestras a 1, 2, 3 y 4 h, a concentraciones de Doxo de 5 y 25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Los controles de toxicidad realizados con las micelas de GM_1 puras y los anticuerpos no exhibieron actividad citotóxica en las células en las condiciones del ensayo.

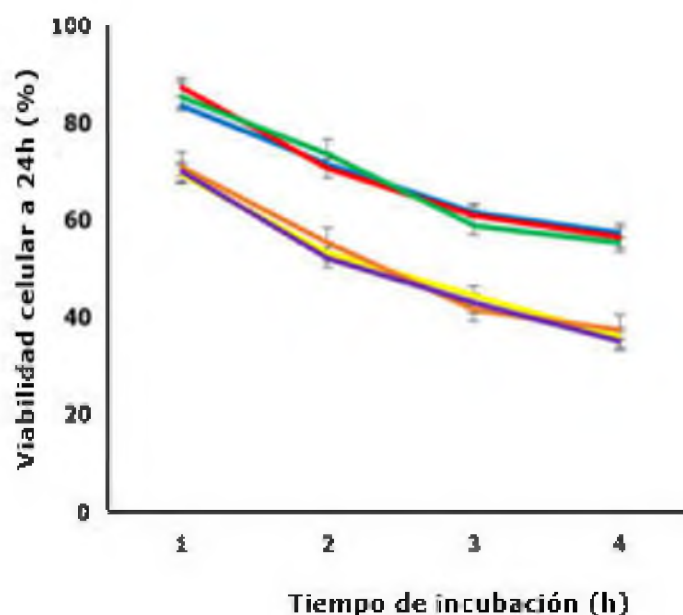


Figura 32: Efecto citotóxico *in vitro* de GM_1 -IgG anti-CD44/Doxo, GM_1 /Doxo y GM_1 -IgG total/Doxo después de 1, 2, 3 y 4 h de incubación sobre células H1299, con dos concentraciones de Doxo. GM_1 /Doxo con $[\text{Doxo}]_{\text{efec}}$ de: $5\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (—), GM_1 -IgG anti-CD44/Doxo con $[\text{Doxo}]_{\text{efec}}$ de: $5\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (—), GM_1 -IgG total/Doxo con $[\text{Doxo}]_{\text{efec}}$ de: $5\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (—), GM_1 /Doxo con $[\text{Doxo}]_{\text{efec}}$ de: $25\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (—), GM_1 -IgG anti-CD44/Doxo con $[\text{Doxo}]_{\text{efec}}$ de: $25\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (—) y GM_1 -IgG total/Doxo con $[\text{Doxo}]_{\text{efec}}$ de: $25\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (—). Las barras de error indica la DS de la media ($n=5$)

Como se puede ver, la actividad citotóxica de la Doxo incorporada en el sistema GM_1 -IgG anti-CD44/Doxo no muestra diferencias significativas respecto a la droga en las otras dos formulaciones, GM_1 -IgG inespecífico/Doxo y GM_1 /Doxo.

Resultados similares fueron obtuvieron con las restantes combinaciones anticuerpo-línea celular específica analizada. Inclusive, cuando se analizó con concentraciones de Doxo más bajas a tiempos de incubación más prolongados.

Del mismo modo, los ensayos realizados con Ptx cargado en los diferentes sistemas GM_1 -IgG anti- $R_{\text{especifico}}$ /Ptx, no revelaron diferencias significativas en la viabilidad celular de las líneas celulares utilizadas respecto a los sistemas GM_1 -IgG inespecífico/Ptx y GM_1 /Ptx.

Estos resultados sugieren que la presencia del anticuerpo en la estructura micelar no modifica la liberación y captación del fármaco. En este punto cabe mencionar algunos detalles que condicionan la interpretación de la utilidad del sistema propuesto, por un lado hay que considerar el hecho de que las micelas de GM₁ se fusionan muy rápidamente con las células *in vitro*, lo que podría determinar que el tiempo requerido para un reconocimiento específico no fuera suficiente. Por otra parte, los cultivos *in vitro* constituyen un sistema estático, muy distinto a lo que sucede *in vivo*.

5.5 Discusión

La utilización de anticuerpos contra antígenos expresados selectivamente en la superficie de células cancerosas es una estrategia terapéutica ampliamente difundida en ciencia, no solo como inmunoterapia dirigida por su propia función efectora, sino por su potencial para dirigir fármacos o sistemas transportadores de fármacos a tejidos o células específicas [148,149]. En este capítulo se describe la incorporación de anticuerpos en micelas de GM₁, con el objetivo de combinar las propiedades de las micelas como nanotransportadores de fármacos oncológicos [80,81] con la capacidad de reconocimiento específico de los anticuerpos.

Considerando que las micelas de GM₁ pueden interactuar e incorporar Alb en su estructura a través de interacciones hidrofóbicas [106], se llevó a cabo la unión no covalente de los anticuerpos a las micelas de GM₁ variando diferentes factores fisicoquímicos y evaluando la influencia de cada uno de ellos. Se observó que la interacción entre los anticuerpos y las micelas es altamente dependiente de condiciones tales como la temperatura y el pH. Dicha interacción se ve favorecida a medida que aumenta la temperatura. Asimismo, se evidenció que el tratamiento térmico a 55°C de las micelas de GM₁ solas, previo a la incubación con los anticuerpos favorece aún más la asociación entre ellos. Esto podría deberse a la deshidratación de los grupos polares y el aumento de la hidrofobicidad que sufre la estructura de las micelas a esa temperatura [145-147]. Esta condición particular evita exponer las moléculas de IgG a altas temperaturas, condición bajo la cual podría comprometer su funcionalidad. Por otra parte, la incubación a pH 4,5 también favorece la interacción, en esta condición, las moléculas de IgG se encuentran en un estado de

“desnaturalización conformacional reversible”, en la cual exponen parte de sus residuos hidrofóbicos, especialmente los del fragmento F_c , aumentando las interacciones de tipo hidrofóbica con las micelas. Además, se comprobó que la adición de altas concentraciones salinas no previene la interacción entre las micelas y los anticuerpos, lo que refuerza la idea que la unión entre ambos es de naturaleza hidrofóbica. En la condición de mayor interacción se pueden obtener complejos GM_1 -IgG estables hasta una relación 4/1 (p/p).

La caracterización del complejo GM_1 -IgG por DSC y TEM muestran que poseen un tamaño significativamente mayor que las micelas de GM_1 puras, 20,8-25,1nm y 11,9-14,2nm respectivamente, aumento relacionado con la cantidad de IgG en el complejo. También se demostró que los complejos GM_1 -IgG son capaces de cargar fármacos como Ptx o Doxo aunque es necesario seguir un orden específico en la preparación para obtener complejos ternarios GM_1 -IgG/fármaco estables. El Ptx debe ser incorporado en las micelas antes de la incubación con los anticuerpos, la presencia previa de IgG en la estructura micelar impide su incorporación, lo que nos sugiere que los anticuerpos ocupan dominios más externos en la estructura micelar. Siguiendo el orden mencionado se consigue formular GM_1 -IgG/Ptx hasta una relación GM_1 /Ptx 5/1 mol/mol. Respecto a la Doxo, su incorporación depende de la cantidad de IgG unida a la micela y viceversa, lo que nos sugiere que ambas moléculas, la IgG y Doxo, comparten algunos sitios de unión en las micelas. En el complejo GM_1 -IgG de relación 4/1 (p/p), es posible encapsular Doxo hasta una relación GM_1 /Doxo de 20/1 (mol/mol).

Los resultados demuestran que los complejos GM_1 -IgG logran superar dos de los principales inconvenientes que se presentan cuando se emplea un procedimiento de unión no covalente, uno hace referencia al desplazamiento de los anticuerpos por proteínas plasmáticas y el otro a la pérdida de funcionalidad debido a una mala orientación de los anticuerpos durante su unión a la micela. Si bien en principio los resultados muestran que la Alb desplaza a los anticuerpos de la estructura micelar, se demostró que ese desplazamiento se puede evitar revirtiendo el pH ácido de preparación a pH 7,4 antes de incubar con la proteína. Por otra parte, los estudios por citometría de flujo, inmunoanálisis e IHC, así como el cultivo con líneas celulares, demostraron que los anticuerpos mantienen su capacidad de reconocimiento antigénico después de unirse por asociación física a las micelas.

Por último, los ensayos de citotoxicidad *in vitro* revelaron que los fármacos encapsulados en los complejos GM₁-IgG anti-R_{específico}/fármaco producen un efecto biológico similar al de las drogas cargadas en GM₁-IgG inespecífico/fármaco y GM₁/fármaco, demostrando la misma eficacia para inhibir el crecimiento de células tumorales en cultivo. La similitud del efecto citotóxico entre las distintas formulaciones de un mismo fármaco puede deberse a la rápida inserción o incorporación de las micelas de GM₁ en las células, que antecede a la participación del anticuerpo. También puede estar relacionado con la baja capacidad de internalización que presentan los anticuerpos utilizados. De hecho, es bien conocido que la mayoría de los anticuerpos monoclonales se desarrollaron para cumplir funciones inmunitarias efectoras y no para ser internalizados. En un sistema de direccionamiento activo, el anticuerpo se usa principalmente como "gancho" para facilitar la unión del nanotransportador con la célula que expresen los correspondientes ligandos y, de esa manera, aumentar la retención en el sitio de interés. Pero, por otro lado, los anticuerpos son moléculas terapéuticamente útiles por sí mismos, capaces de producir efectos farmacológicos directos, como bloquear la interacción de un receptor con un ligando, interferir con un proceso de multimerización o activar la internalización de receptores o la apoptosis de células diana; con numerosas opciones intermedias de modulación celular [150,151]. La incorporación de anticuerpos con distintos mecanismos de acción nos ofrece la oportunidad de diseñar formulaciones de GM₁-IgG-fármaco para ser utilizadas con diferentes fines terapéuticos. Por ejemplo se podría combinar dos terapias en un único sistema a partir de la unión de un anticuerpo con efecto antiangiogénico sumado a la actividad del fármaco vehiculizado en la micela. También se puede contemplar el diseño de sistemas multifuncionales con anticuerpos y más de un fármaco efector (Ptx y Doxo), o sistemas de anticuerpos dirigidos a diferentes objetivos. Además, la incorporación de anticuerpos en la estructura micelar sin fármacos se podría plantear como estrategia de mejora en las propiedades farmacocinéticas y de biodistribución de los anticuerpos, que muchas veces no logran la efectividad buscada por baja semivida plasmática o porque no llegan a los tejidos tumorales; variables en las cuales las micelas de GM₁ podrían ofrecer ventajas sustanciales como la de cruzar la barrera hematoencefálica y entrar en el cerebro [102].

5.6 Conclusión

En este capítulo se presentan resultados que demuestran la capacidad de las micelas de GM₁ para interaccionar e incorporar IgG en su estructura, manteniendo su capacidad para cargar fármacos con diferentes características físico-químicas. En resumen, los resultados descriptos muestran que:

- Se puede incorporar anticuerpos IgG en micelas de GM₁ en forma estable, simple y eficiente.
- El anticuerpo incorporado mantiene su actividad biológica de reconocimiento de su antígeno específico.
- Las micelas modificadas con IgG mantienen su capacidad de vehiculizar fármacos como Ptx y Doxo, pero su preparación requiere seguir un orden adecuado para obtener la máxima capacidad de carga.
- El modelo GM₁-IgG/fármaco puede ser propuesto como sistema dual o multifuncional, en el cual se combina la acción de varios anticuerpos con el transporte de fármacos; con el potencial para ser utilizados en diferentes fines terapéuticos.

6. CAPÍTULO 3

Incorporación de lipoproteínas en la superficie de micelas de GM₁

6.1 Resumen

Se conoce que algunas lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL) pueden funcionar como vehículos para el transporte de fármacos con direccionamiento activo debido a su estructura y captación preferencial por receptores específicos. Sin embargo, su capacidad de carga es baja y no resultan eficientes. En este capítulo se muestran los resultados obtenidos a partir de la unión de LDL y HDL a las micelas de GM₁, un nanotransportador de demostrada eficacia. Además, se caracterizan las estructuras que resultan de esa interacción y se evalúa el efecto biológico *in vitro* del fármaco incorporado en el complejo GM₁-lipo, en comparación con el de GM₁ sin carga.

Los resultados demuestran que las micelas de GM₁ son capaces de interaccionar tanto con las LDL como las HDL en forma espontánea, generando complejos GM₁-LDL y GM₁-HDL estables, solubles en agua. Las evidencias sugieren que en la interacción participan fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas, reguladas por condiciones tales como pH, temperatura y fuerza iónica.

Los complejos GM₁-LDL son capaces de incorporar Ptx o Doxo en su estructura, pero al igual que los complejos GM₁-IgG del capítulo anterior, se debe seguir un orden determinado de preparación para obtener complejos ternarios GM₁-LDL/fármaco eficientes. Por otra parte, los complejos GM₁-HDL demuestran ser poco eficientes y tienen baja estabilidad en solución acuosa.

Los ensayos de DLS y TEM revelan que el tamaño de los complejos GM₁-LDL es considerablemente más grande que la suma de los compuestos individuales, con una distribución de población más amplia, reflejando la participación de varias moléculas en la formación de los complejos. Asimismo, los complejos GM₁-LDL presentan una elevada carga superficial electronegativa (-55,9 mV), la cual contribuye a la mayor estabilidad de estos complejos.

Por último, los ensayos *in vitro*, sobre cultivos celulares, muestran que la presencia de LDL unida a micelas de GM₁ produce un aumento de la muerte celular respecto del fármaco libre. Además, se demuestra la participación de un sistema de captación activo, dependiente de energía, vinculado a las LDL en la incorporación de fármacos (Doxo, Ptx) en las células tumorales. Sin embargo, no se puede confirmar que el sistema de transporte sea únicamente a través de los RLDL específicos.

En conclusión: La unión de lipoproteínas, especialmente la LDL, a micelas de GM₁ permite formular un sistema que reúne las propiedades de ambos compuestos. Esto permite proponer al modelo GM₁-LDL/fármaco como una alternativa interesante a considerar para la administración de fármacos con captación selectiva.

6.2 Introducción

Una vía de direccionamiento activo explorada en la terapia contra el cáncer es a través de la utilización de lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL) debido a su captación preferencial por receptores específicos sobreexpresados en células tumorales. Estas moléculas son complejos macromoleculares que presentan un rango amplio de diámetros que van desde los 10 nm, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) a más de una micra, los quilomicrones (QM). Todas están formadas por una cubierta hidrofílica compuesta de una monocapa de fosfolípidos intercalados con componentes proteicos (apolipoproteínas) y un núcleo lipídico hidrofóbico que contiene triglicéridos, colesterol y ésteres de colesterol (fig. 33). Las cinco familias de lipoproteínas se diferencian entre sí por contener distintas proporciones de lípidos y apoproteínas, lo cual les confiere distinta densidad de flotación y tamaño. Su principal función es transportar moléculas lipídicas de unos órganos a otros en el medio acuoso del plasma, en el cual, cada clase cumple un rol diferente.

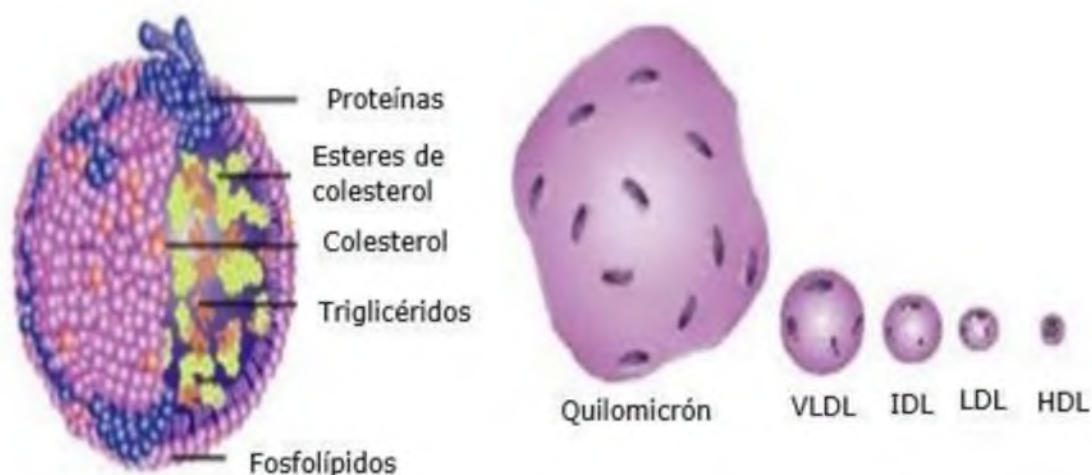


Figura 33: Estructura y clasificación de las lipoproteínas según la separación por ultracentrifugación a diferentes densidades características para cada familia lipoproteica. Las variaciones en la densidad y tamaño están determinadas por su composición relativa en lípidos y proteínas. También pueden separarse por sus diferencias de tamaño, movilidad electroforética y composición apoproteica.

Como se menciona previamente, estas estructuras se caracterizan por tener una captación preferencial a través de receptores específicos de tejido, algunos de los cuales reconocen varias clases de lipoproteínas. Las apolipoproteínas, representan la parte biológicamente más activa de las lipoproteínas, ya que actúan como cofactores enzimáticos y son las que posibilitan el reconocimiento de las mismas por los receptores.

Por otra parte, se conoce que algunas de ellas pueden funcionar como vehículos para el transporte de fármacos con direccionamiento a células específicas [152-156]. Algunas de las ventajas que ofrecen las lipoproteínas como transportadores de fármacos incluyen: su biocompatibilidad; su relativamente larga vida media en circulación (2-3 días) y lenta eliminación por el sistema RES; el tamaño de partícula pequeño de muchas de ellas, que permite su extravasación desde el compartimento vascular a compartimentos extravasculares; su núcleo apolar interno, dominio ideal para el transporte de fármacos altamente hidrofóbicos; una cubierta polar donde se podrían incorporar fármacos anfifílicos; la protección de los fármacos cargados del medio fisiológico durante su transporte y la captación selectiva a través de la interacción mediada por receptores específicos, que regula el nivel de internalización y puede mediar la captación celular del fármaco incorporado [157].

Los fármacos pueden dirigirse activamente a las células cancerosas porque

éstas expresan un alto nivel de receptores de lipoproteínas en respuesta a la gran demanda de lípidos que necesitan para la síntesis de nuevas membranas. La incorporación del agente terapéutico en la estructura de las lipoproteínas depende tanto del método utilizado como así también de la naturaleza química de la molécula. Se ha descrito la incorporación mediante conjugación covalente del fármaco al fosfolípido o proteína de la lipoproteína, por intercalación o adsorción del agente en la cubierta de fosfolípidos, y también la encapsulación del agente en el núcleo de las nanopartículas a través de técnicas de reconstitución [157,158].

En este sentido, la lipoproteína más estudiada es la LDL, de ≈ 20 nm de diámetro, que contiene un componente proteico único muy grande, la apolipoproteína B₁₀₀ (550 kDa, 4,536 residuos de aminoácidos), que abarca aproximadamente el 40% de su superficie. Esta proteína es la responsable del reconocimiento y unión a receptores celulares específicos de alta afinidad, el receptor B:E, también llamado receptor de LDL (RLDL). Después de la unión a estos receptores, una glicoproteína de transmembrana situada en depresiones recubiertas de clatrina en la superficie celular, la LDL se internaliza y degrada en los lisosomas con la subsiguiente liberación del colesterol para su uso en la célula [159,160]. Debido a la mayor actividad o sobreexpresión del receptor de LDL en células tumorales y en consecuencia la mayor captación de LDL por estos tejidos [161], la LDL fue propuesta como un vehículo selectivo útil para el suministro de fármacos citotóxicos y el RLDL como un blanco atractivo para la captación selectiva de fármacos en células tumorales [162,163]. Del mismo modo, las nanopartículas de LDL han sido propuestas como método de diagnóstico y monitoreo mediante la incorporación de agentes de contrastes o sondas fluorescentes [158,164].

Igualmente, ha sido descrita la utilización de HDL, la lipoproteína más pequeña (8-12 nm), formada por un 50 % de apoproteínas y 20% de colesterol, como sistema de vehiculización de profármacos hidrofóbicos [165] y citostáticos contra el cáncer [153,154,166,167]. Hay evidencias que indican que las HDL también puede ser una fuente de colesterol en algunas neoplasias malignas y que su receptor específico, involucrado en la captación del colesterol HDL (SR-BI), se encuentra sobreexpresado en varios tipos de células cancerosas [168]. Se discute además, si nanopartículas sintéticas de HDL, que incluyen o no proteínas humanas o recombinantes, pueden direccionar moléculas directamente al citoplasma de ciertas células cancerosas, evitando el compartimiento endosomal

[169-171], estrategia que podría permitir usar nanopartículas símil HDL para administrar fármacos con actividad en el citoplasma.

No obstante, y a pesar que numerosos estudios han obtenido resultados prometedores, la utilidad práctica de las lipoproteínas como nanotransportadores de fármacos se ve obstaculizada por varios factores, como su baja capacidad de carga, la dificultad de vehiculizar fármacos anfífilos, la variabilidad de lote a lote, ya que sólo pueden almacenarse por periodos cortos antes de que los procesos de agregación y degradación comprometan la estabilidad de la muestra, etc. Además, en algunos casos se ha demostrado que la incorporación de fármacos induce sutiles modificaciones en la estructura que modifica su comportamiento *in vivo* [161,164].

En este contexto, evaluamos la interacción entre las micelas de GM₁ con distintas fracciones de lipoproteínas y caracterizamos las estructuras que resultan de esta interacción, con el fin de reunir las potencialidades de cada componente en un mismo sistema.

Existen antecedentes previos que describen la interacción entre gangliósidos y lipoproteínas [172-175], donde concluyen que la superficie de LDL posee sitios que reconocen secuencias específicas de carbohidratos de glicoconjugados. Además, demuestran que la incorporación de ácidos siálicos en su superficie, debido a la unión con gangliósidos, modula significativamente su absorción en determinadas células.

Considerando el tamaño de las distintas fracciones lipoproteicas, utilizamos las LDL y HDL, ambas con diámetros inferiores a 40 nm para evaluar su unión a las micelas de GM₁. Además, analizamos el efecto biológico y la toxicidad *in vitro* de los fármacos incorporados en el complejo GM₁-lipo, en comparación con aquellos cargados en GM₁ puras.

6.3 Materiales y métodos

6.3.1 Materiales

- Plasma humano: Unidades de 250ml c/u fueron provistas por el Instituto de Hematología y Hemoterapia. Banco de Sangre. Córdoba. Serología no reactiva. Utilizadas para la purificación de las lipoproteínas.
- Método enzimático Colestat para la determinación cuantitativa de colesterol en

suero o plasma. Número de referencia 1220114. Lote 1210101120 2014/04. Marca Wiener Lab.

-HDL Colesterol FT. Reactivo precipitante. Número de referencia 1220108. Lote 1210100210 2014/04. Marca Wiener Lab.

-Las soluciones de GM₁, Ptx y Doxo se prepararon como se mencionó previamente en el capítulo 1.

-Todos los demás reactivos de grado analítico se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania) y se usaron como se recibieron.

-Para los cultivos celulares se utilizó medio de cultivo Dulbecco MEM (medio esencial mínimo) suplementado con suero fetal bovino irradiado (NATOCOR, Córdoba, Argentina) al 1 ó al 5 % (v/v) según condiciones de mantenimiento o de crecimiento respectivamente.

6.3.2 Métodos

6.3.2.1 Obtención y purificación de las lipoproteínas LDL y HDL

La purificación de LDL y HDL se realizó según el método descrito por Burstein et al, Journal of Lipid Research, 1970 [176], para el aislamiento selectivo de las lipoproteínas de suero humano mediante precipitación con polianiones y cationes divalentes.

A 250ml de plasma humano se le adicionó 25ml de Fosfotungstato de Sodio (NaPhT) al 4% (concentración final: 0,4 %) y 6,25ml de Cloruro de Magnesio (MgCl₂) 2 M (concentración final 0,05 M). En esta condición precipita de forma inmediata, completa y selectiva las fracciones VLDL y LDL. El precipitado fue removido por centrifugación (10min a 6000g). A continuación, la fracción de LDL fue separada de la VLDL por ultracentrifugación (a 10000g en buffer de densidad: 1.006). La fracción aislada de LDL en buffer TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM) fue nuevamente precipitada con NaPhT al 4% (concentración final: 0,4 %) y MgCl₂ 2 M (concentración final 0,05 M). Luego, fue lavada y resuspendida en buffer TE; NaCl 150mM. Para remover impurezas fue dializada extensamente contra el mismo buffer TE; NaCl 150mM e inmediatamente filtrada a través de un filtro de membrana (Millipore, tamaño de poro de 0,45 µm). Por último, se adicionó DMSO (V_{final}: 10%) y se fraccionó en alícuotas de 1,5ml c/u antes de ser almacenadas en freezer a -80°C. La pureza fue analizada mediante electroforesis

en gel de agarosa y la concentración determinada por un método enzimático.

Al sobrenadante I, libre de VLDL y LDL, se le adicionó 225ml de NaPhT al 4% (concentración final: 2 %) y $MgCl_2$ (concentración final 0,025 M). Precipitó inmediatamente una fracción que es removida por centrifugación (10min a 6000g). Ese precipitado no contiene lípidos, contiene mayormente gamma globulinas.

Al sobrenadante II se le adicionó 43,8 ml de $MgCl_2$ 2M (NaPhT: concentración final: 2 %; $MgCl_2$: concentración final 0,2 M). Comienza a decantar una fracción, pero la precipitación se completa después de 2 h. Pasado ese tiempo se centrifugó la mezcla durante 30 min a 20000g. El precipitado obtenido contiene la fracción HDL. Inmediatamente fue lavado con una solución de NaCl al 1%; NaPhT al 0,4%; $MgCl_2$ 0,1 M y nuevamente centrifugado (30 min a 20000g). Finalmente, el precipitado fue resuspendido en buffer TE; NaCl 150mM y dializado extensamente contra el mismo buffer antes de ser filtrado a través de un filtro de membrana (Millipore, tamaño de poro de 0,45 μm). Se adicionó DMSO (V_{final} : 10%) y se fraccionó en alícuotas de 1,5ml c/u antes de ser almacenadas en freezer a -80°C. La pureza fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa y la concentración determinada por un método enzimático.

6.3.2.2 Determinación de la concentración de la fracción LDL y HDL purificadas

La concentración de las fracciones purificadas de LDL y HDL fue determinada midiendo la concentración del colesterol asociado a las mismas por el método enzimático Colestat de Wiener Lab, utilizando colesterol como estándar.

Brevemente, se colocó 10 μl de cada fracción, se adicionó 1ml del reactivo enzimático colesterol oxidasa/peroxidada y se los incubó 5 min en baño de agua a 37°C o 20 min a temperatura ambiente (25°C) antes de ser leídos en un espectrofotómetro a 505nm. Del mismo modo, se procesaron dos tubos, uno conteniendo 10 μl de un estándar de colesterol (E) de concentración conocida y otro solo con agua, indicado como blanco, utilizado para descontar lecturas provenientes de los reactivos. El color de la reacción final es estable por 30 min. La concentración final de cada fracción se obtuvo al aplicar la fórmula Colesterol (g/l): $D \times f$ donde f : 2 (g/l). E^{-1} .

6.3.2.3 Preparación de los complejos de GM₁-lipoproteínas

Las soluciones de GM₁ a 10 y 20 mg.ml⁻¹, se prepararon 24 h antes de su uso diluyendo la solución madre de GM₁ previamente filtrada en agua bidestilada. Alícuotas de LDL y HDL purificadas y almacenadas en buffer TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM); NaCl 150mM con 10% de DMSO a -80°C fueron descongeladas y dializadas exhaustivamente contra agua durante 24h antes de su uso. Luego, cantidades crecientes de estas fracciones se incubaron con las micelas de GM₁ a diferentes condiciones de pH (3; 4,5 y 7,4), temperatura (4, 25, 37, 45 y 55°C) y fuerza iónica (hasta 1 M de NaCl). Los resultados de estos ensayos se analizaron por electroforesis, turbidimetría y espectrometría de absorción utilizando Merocianina 540 (MC 540).

6.3.2.4 Cuantificación de la LDL o HDL asociada a las micelas de GM₁

La cantidad de LDL o HDL unida a las micelas de GM₁ fue determinada mediante absorción a 560nm de la sonda lipofílica Merocianina 540 (MC 540), previamente incorporada en la estructura de las lipoproteínas.

La MC 540 es una sonda lipofílica ampliamente utilizada para investigar propiedades de membrana como el empaquetamiento de los fosfolípidos y la transición de fases. Cuando se agrega externamente a una suspensión acuosa de liposomas o lipoproteínas, particiona y se incorpora fácilmente en las bicapas de fosfolípidos o dominios lipídicos. Luego de incorporar la sonda, se incubaron cantidades crecientes de estas suspensiones con una solución de micelas de GM₁, a 10 mg.ml⁻¹ durante 4 h a 37°C. Pasado ese tiempo, se adicionó ácido tricloroacético (TCA) 10% para precipitar las proteínas asociadas a las lipoproteínas y se centrifugo durante 10min a 10000g. La absorbancia de la MC 540 fue medida en los sobrenadantes y comparada con los controles.

6.3.2.5 Caracterización de los complejos GM₁-lipoproteínas

6.3.2.5.1 Electroforesis en gel de agarosa

Se analizó la movilidad electroforética de LDL y HDL nativas, así como de los complejos GM₁-LDL y GM₁-HDL en geles de agarosa utilizando plasma humano como control. Cada muestra se preincubó con el colorante para lípidos Sudan-Black B solubilizado en 30% etanol, durante 20 min a temperatura ambiente. Luego, se le adicionó un volumen de sucrosa al 40% (p/v), se mezcló y se cargó 15 µl de c/u en un gel de agarosa al 0,7 % (p/v) en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) (pH 8). La corrida se realizó a tensión constante (100 V) durante 60 min y la movilidad de cada muestra se visualizó por la tinción.

Para evaluar la interacción de las micelas con las lipoproteínas se prepararon diferentes relaciones peso/peso de GM₁-LDL, desde \approx 10/1 a 40/1, a partir de una cantidad fija de LDL y cantidades crecientes de GM₁, y viceversa. Cada muestra se procesó, se corrió en geles de agarosa y analizó como se describió anteriormente. De igual forma se realizó para GM₁-HDL.

6.3.2.5.2 Determinación del tamaño de partícula y el potencial zeta

El diámetro medio de partícula, el IP y el potencial zeta de los complejos GM₁-lipoproteína se midieron en un analizador Delsa™Nano analyzer (Beckman Coulter Instruments), mencionado en los capítulos precedentes. Los distintos complejos fueron diluidos con buffer PBS pH 7,4 y filtrados antes de la medición. Los datos del tamaño y distribución se analizaron por el software Delsa Nano Beckman Coulter (versión 2.2) proporcionado por el fabricante con el método de análisis CONTIN. Todas las mediciones se realizaron por triplicado, para cada uno de tres lotes independientes de muestras. El potencial zeta se determinó por triplicado y los resultados se calcularon automáticamente por el analizador.

6.3.2.5.3 Microscopía electrónica

La morfología de los complejos obtenidos fue observada en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1200 EX II a 300000 aumentos. Se cargaron 50 µl del complejo en una rejilla de carbono, se incubó por 5 min y luego se secó. El exceso de muestra se lavó con agua bidestilada. De igual forma se procesó una muestra de GM₁. Por último, las rejillas se incubaron con 50 µl de

una solución de acetato de uranilo al 10 % por 1 min, se secaron y finalmente fueron llevadas al microscopio para su observación.

6.3.2.6 Incorporación de Ptx o Doxo en los complejos GM₁-lipoproteína

La capacidad de los complejos GM₁-lipoproteína para cargar fármacos fue evaluada mezclando GM₁-lipoproteína, a distintas relaciones peso/peso, con cantidades crecientes de Ptx o Doxo, hasta alcanzar relaciones molares GM₁/fármaco desde 50/1 a 1/1. La carga se realizó a 20°C durante 30 min y se las mantuvo a esa temperatura durante 24 h. Pasado ese tiempo, fueron dializadas contra agua por 24 h o eluídas a través de una columna de exclusión por tamaño, para separar el fármaco libre del incorporado en el complejo. Se analizó además la influencia del orden o secuencia de la preparación. El fármaco incorporado fue cuantificado según lo descrito para Ptx o Doxo.

6.3.2.6.1 Determinación de la concentración de Ptx

La cuantificación de Ptx se llevó a cabo por HPLC (High-performance liquid chromatography) como se mencionó previamente en el capítulo 1.

6.3.2.6.2 Determinación de la concentración de Doxo

La concentración de Doxo incorporada en los complejos se determinó midiendo la absorbancia a 490 nm usando una curva de calibración realizada con una solución estándar de Doxo en solución fisiológica, como se describió anteriormente en el capítulo 1.

6.3.2.7 Citotoxicidad *in vitro* de los complejos GM₁-lipoproteína/fármaco

Las líneas celulares Hep-2, HeLa y Vero, se cultivaron en medio MEM suplementado con 5% de suero fetal bovino a 37°C con 5% de CO₂. Las monocapas crecidas a confluencia en placas de 96 pocillos se incubaron con concentraciones crecientes de micelas de GM₁/Doxo o GM₁-lipoproteína/Doxo a

diferentes tiempos, luego de lo cual se reemplazó el medio con la muestra por medio sólo y se dejó 24 h a 37°C y con 5 % de CO₂. Finalmente, las células se lavaron tres veces con buffer PBS y la cantidad de células sobrevivientes fue determinada usando un ensayo de tinción con cristal violeta. Para ello, las células fueron fijadas con formol al 10%, lavadas y teñidas con una solución de cristal violeta al 0,4% en metanol durante 15 min. Por último, fueron cuidadosamente lavadas con agua y se añadió una solución de ácido acético al 5% para disolver el color.

El análisis cuantitativo se realizó mediante mediciones de absorbancia en un lector de placas automatizado (BioRad., CA, EE.UU.) a 570 nm. El efecto sobre el crecimiento celular se calculó como la diferencia en la absorbancia en presencia y ausencia de muestras y entre muestras. Se tomó como control negativo, 100% de supervivencia celular, a células no tratadas a las que se adicionó solamente medio de cultivo. Los resultados representan valores medios de cinco mediciones y sus respectivas desviaciones. El análisis estadístico se realizó como se mencionó en el capítulo precedente 1.

Los ensayos de temperatura, fueron realizados de forma similar, incubando las células a 4°C durante 30 min, antes de añadir las muestras a evaluar.

Los ensayos con Ptx se realizaron sobre las mismas líneas celulares utilizando un protocolo similar al descrito para Doxo, excepto que se realizó a un solo tiempo de incubación de 24hs antes de reemplazar la muestra por medio solo.

En todos los ensayos se realizaron además controles de citotoxicidad con las micelas de GM₁ y las lipoproteínas LDL solas para excluir el efecto de los componentes individuales.

6.3.2.8 Efecto de la liofilización

Las micelas de GM₁-LDL (relación 10:1 p/p) cargadas con Doxo a una relación GM/Doxo 10/1 (mol/mol), o Ptx a una relación GM/Ptx 5:1 (mol/mol), fueron congeladas a -80°C por 24 h para luego ser liofilizadas y almacenadas a 4°C durante 120 días. Al cabo de ese tiempo fueron resuspendidas a volumen inicial con agua bidestilada y diluidas en medio de cultivo hasta alcanzar la concentración de trabajo del fármaco. En esa condición, se evaluó su efecto citotóxico usando el ensayo con cristal violeta como se describió previamente. El

resultado fue comparado al producido por las mismas formulaciones preparadas el día del ensayo.

6.4 Resultados

6.4.1 Interacción de las micelas de GM₁ con las LDL o HDL.

El primer objetivo de este trabajo fue formular un complejo compuesto de micelas de GM₁ y lipoproteínas que conserven la capacidad de las micelas para cargar fármacos. Para ello, se incubaron fracciones de LDL y HDL purificadas a partir de plasma humano, con micelas de GM₁ para evaluar interacción o asociación entre las mismas, que se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa.

La fig. 34A muestra el perfil de migración obtenido para las mezclas entre GM₁ y LDL a diferentes relaciones de masa. Se puede ver que las mezclas migraron con un perfil diferente respecto a sus componentes individuales, y que la distancia de migración varía según la relación GM₁-LDL utilizada. Por otra parte, se observa una banda en la posición de siembra, principalmente en el carril correspondiente a la LDL, lo que revela que una fracción de LDL no migra, debido probablemente a la formación de agregados. Sin embargo, en función de la cantidad de GM₁ presente en la mezcla, esa banda se reduce considerablemente. Estos resultados sugieren que las micelas de GM₁ son capaces de interaccionar con las LDL y migrar asociadas en forma de complejos.

Respecto a la interacción entre GM₁ y HDL, en la fig. 34B se muestra el perfil de migración de las mezclas a diferentes relaciones de masa, donde pueden observarse dos perfiles diferentes. A baja cantidad de GM₁, la mezcla migra en una sola banda a una distancia intermedia respecto a los componentes individuales. Esto señala que las micelas de GM₁ también son capaces de interaccionar con las HDL y migrar asociadas. Cuando aumenta la cantidad de GM₁, se observan dos bandas, una inferior a una distancia similar a la anterior y otra que migra menos y crece en intensidad en relación directa con la cantidad de GM₁. Este resultado sugiere que los complejos formados entre GM₁-HDL se reorganizan para conseguir su configuración más estable dando origen a dos poblaciones, cuya formación depende de la relación de GM₁/HDL utilizada.

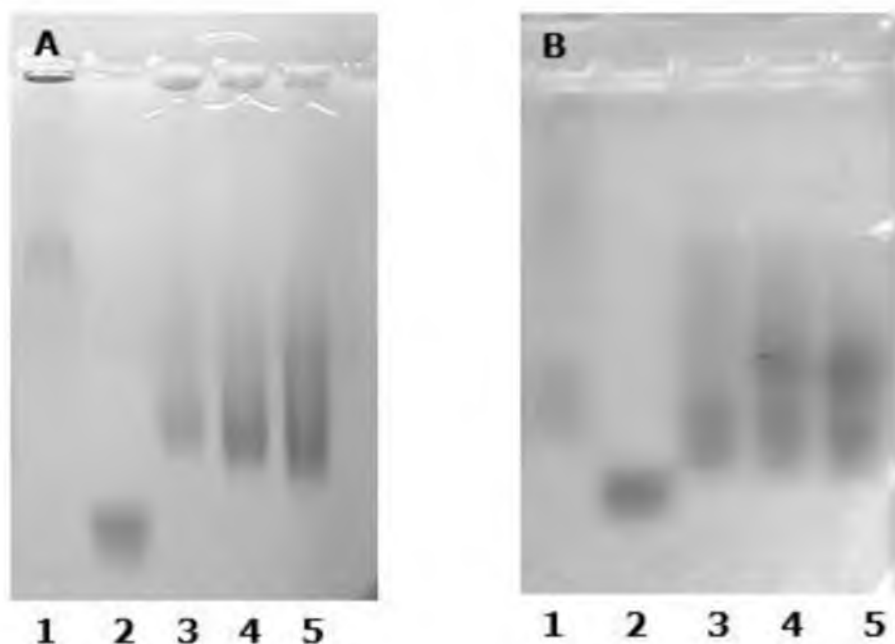


Figura 34: Electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. **A:** LDL incubada con cantidades crecientes de GM_1 a pH 5,5 y 37°C. Los carriles 1-2 corresponde a los estándares de LDL y GM_1 ; Carril 3-5: relación de masa GM_1 /LDL 4/1, 8/1 y 12/1 p/p, respectivamente. **B:** HDL incubada con diferentes cantidades de GM_1 a pH 5,5 y 37°C. Los carriles 1-2 corresponde a los estándares de HDL y GM_1 ; Carril 3-5: relación de masa GM_1 /HDL 7/1, 14/1 y 21/1 p/p, respectivamente.

A continuación, se realizaron estudios para evaluar la influencia de variables fisicoquímicas como la temperatura, pH y fuerza iónica sobre la interacción entre las micelas de GM_1 y las distintas lipoproteínas. Después de incubar las micelas con las LDL o HDL a las condiciones seleccionadas, fueron analizadas mediante turbidimetría y electroforesis en geles de agarosa.

Primero, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la interacción de las micelas con las LDL. La fig. 35A muestra que las mezclas GM_1 -LDL preparadas en un rango de temperatura entre 37 y 55°C dieron lugar a soluciones más claras, levemente opalescentes ($< DO$ a 600 nm).

Después de la clarificación por centrifugación o filtración por 0,22 μm se observó que las mezclas preparadas en el rango de 4 a 20°C precipitaron o quedaron retenidas en el filtro, lo que revela formulaciones menos estables con baja cantidad de LDL asociada soluble, mientras que las preparadas en el rango de temperatura entre 37 y 55°C se mantuvieron levemente opalescente, sin cambios significativos en la turbidez, lo que evidencia que el aumento de temperatura favorece la formación de complejos solubles que filtran por 0,22 μm .

Mediante el ensayo con MC 540 se determinó que sólo un 20% de la LDL se mantiene soluble después de incubarlas con las micelas (relación GM₁/LDL 10:1 p/p) a 4°C y precipitarlas con TCA, mientras que a 37°C, más del 80% se mantiene soluble (fig. 35B). Considerando que el GM₁ es la única molécula presente en el medio, aparte de la LDL, el resultado demuestra que la solubilidad de la LDL post TCA se debe a la interacción con las micelas de GM₁.

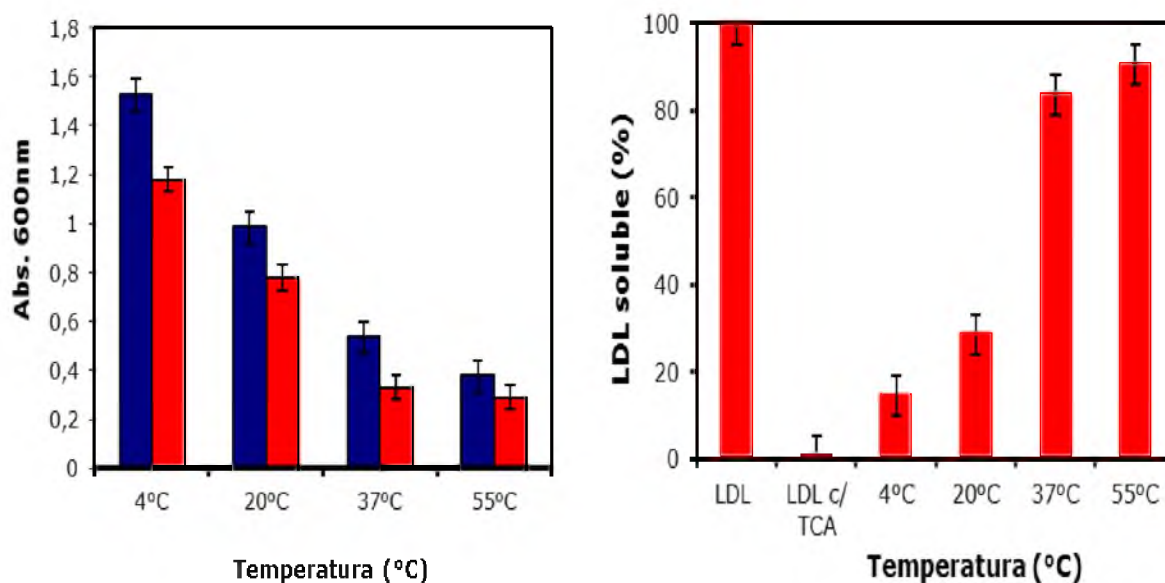


Figura 35: Efecto de la temperatura sobre la interacción entre GM₁ y LDL. **A:** Turbidez de las mezclas GM₁-LDL incubadas a 4, 20, 37 y 55°C, antes de clarificar por centrifugación a 10000g. GM₁/LDL 40/1 p/p (■) y GM₁/LDL 10/1 p/p (■). Lectura λ: 600nm, **B:** Fracción de LDL soluble determinada con MC 540, después de incubar con GM₁ a 4, 20, 37 y 55°C, precipitar con TCA y clarificar por centrifugación a 10000g. GM₁/LDL 10/1. Lectura λ: 560nm. Las barras de error indica la DS de la media (n=3)

La fig. 36 muestra el perfil electroforético de las mezclas GM₁-LDL preparadas a 4, 20, 37 y 55°C, después de la clarificación por centrifugación, donde se pueden observar dos perfiles de migración diferentes. Las mezclas incubadas a 4 y 20°C, muestran un comportamiento similar a las micelas de GM₁ puras, debido probablemente a la baja cantidad de LDL asociada a las micelas, mientras que a 37°C o más migran menos, a distancias intermedias respecto a los componentes individuales, debido a la unión de moléculas adicionales de LDL.

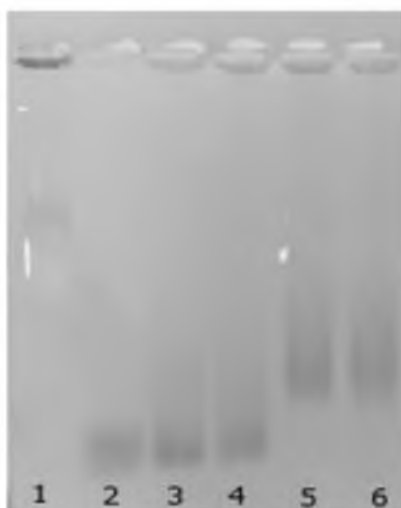


Figura 36: Electroforesis en geles de agarosa al 0.7%. Perfiles de migración de micelas de GM_1 incubadas con LDL a diferentes temperaturas. Los carriles 1-2 corresponde a los estándares de LDL y GM_1 ; Carril 3-6: GM_1 -LDL incubadas a 4°C, 25°C, 37°C y 55°C, respectivamente. Micelas de GM_1 2 mg.mL⁻¹ con LDL 0,24 mg.mL⁻¹.

Con respecto al efecto de la temperatura sobre la interacción GM_1 -HDL, se observó un comportamiento similar al de GM_1 -LDL. Las preparaciones incubadas a 37°C o más se mantuvieron más claras y estables, con mayor cantidad de HDL soluble. En cambio, en las preparadas a 4 y 20°C la lipoproteína es menos estable y tiende a precipitar, lo que conduce a formulaciones con baja cantidad de HDL asociada (fig. 37).

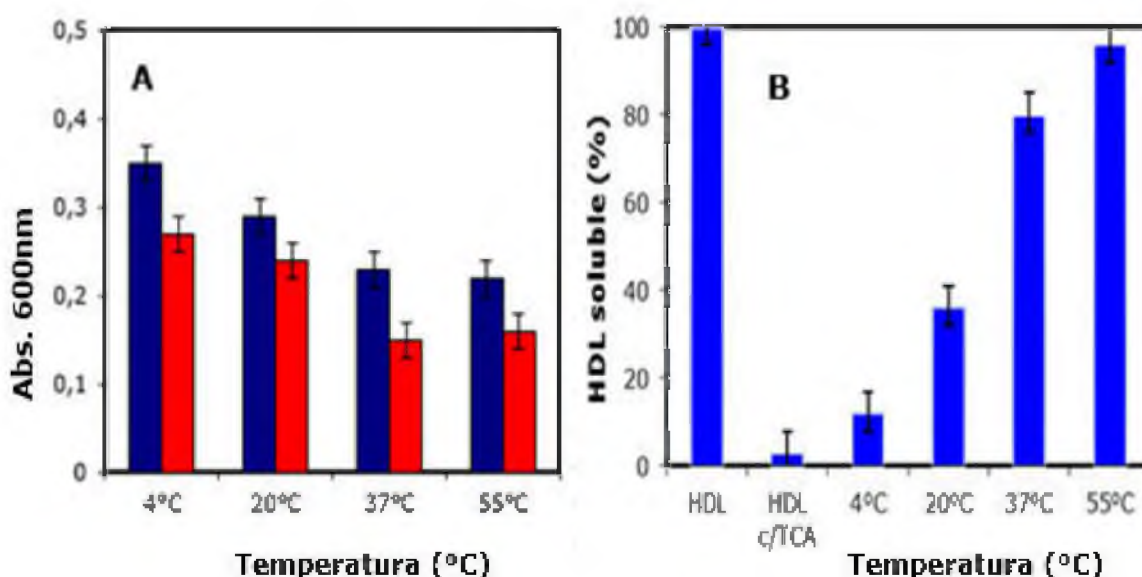


Figura 37: Efecto de la temperatura sobre la interacción entre GM_1 y HDL. **A:** Turbidez de las mezclas GM_1 -HDL incubadas a 4, 20, 37 y 55°C, antes de precipitar con TCA y clarificar por centrifugación a 10000rpm. (■) GM_1 /HDL 40/1 y (■) GM_1 /HDL 10/1 p/p. Lectura λ : 600nm, **B:** Fracción de HDL soluble determinada con MC 540, después de incubar con GM_1 a 4, 20, 37 y 55°C,

precipitar con TCA y clarificar por centrifugación a 10000g. GM_1 /LDL 40/1. Lectura λ : 560nm. Las barras de error indica la DS de la media ($n=3$)

Del mismo modo, el perfil electroforético de las mezclas GM_1 -HDL, preparadas a las distintas temperaturas (fig. 38), mostró un comportamiento similar a GM_1 -LDL aunque menos marcado. A 37°C o más los complejos migraron menos, debido posiblemente a la mayor cantidad de lipoproteína unida a las micelas.



Figura 38: Electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. Perfiles de migración de micelas de GM_1 incubadas con HDL a diferentes temperaturas. Los carriles 1-2 corresponde a los estándares de HDL y GM_1 ; Carril 3-6: GM_1 -HDL incubadas a 4°C, 25°C, 37°C y 55°C, respectivamente. Micelas de GM_1 :1 mg.ml⁻¹ con LDL 0,14 mg.ml⁻¹

En conjunto, estos resultados muestran que la temperatura es un factor determinante en la interacción entre GM_1 y las distintas lipoproteínas, condicionando la estructura de los complejos formados. Esto probablemente responda a cambios en las propiedades de agregación de alguna de las moléculas involucradas, que origina reorganizaciones internas en la estructura.

Del mismo modo, se evaluó la influencia del pH sobre la interacción entre GM_1 y las diferentes lipoproteínas. Después de incubar las micelas con LDL a pH 3; 5,5; 7,4 y 10, se observó que a pH 5,5 y 7,4 se obtienen formulaciones levemente opalescentes, estables en solución y capaces de filtrar por 0,22µm; mientras que a pH 3 y 10, las mezclas fueron más turbias con presencia de grumos o agregados visibles, que precipitaron de forma espontánea.

Posteriormente, las mezclas fueron centrifugadas a 10000g y los sobrenadantes analizados mediante electroforesis en geles de agarosa. La fig. 39A muestra el

perfil electroforético de las mezclas GM_1 -LDL preparadas a los distintos pHs. Puede verse que a pH alcalino (10) no se observa banda de migración, lo que indica ausencia de GM_1 y LDL en el sobrenadante. Considerando la elevada turbidez inicial y el precipitado obtenido después de la centrifugación, el resultado sugiere que este pH favorece la agregación de las moléculas o la formación de complejos GM_1 -LDL insolubles.

Las mezclas incubadas a pH 5,5 y 7,4 muestran un perfil parecido entre ellas, con una leve diferencia en la distancia de migración, que podría deberse a la cantidad de LDL asociada a las micelas o bien, a la influencia del buffer de cada mezcla en la corrida electroforética. Considerando que a estos pH, las mezclas se mantuvieron solubles después de la centrifugación, podemos sugerir que la incubación de GM_1 -LDL a pHs comprendidos entre 5,5 y 7,4, favorece la formación de complejos solubles, estables en medio acuoso y capaces de filtrar por 0,22 μ m, mientras que a pH 3 también se consigue preparar complejos GM_1 -LDL solubles, pero de baja estabilidad.

Con respecto a GM_1 y HDL, la fig. 39B muestra los perfiles de migración de estas mezclas incubadas a los distintos pHs. Se observa un perfil muy similar en todos los casos, una sola banda que migra a distancias intermedias respecto a los componentes individuales, pero de diferentes intensidades. La baja intensidad de las mezclas a pH 3 y 10 sugiere, al igual de GM_1 y LDL, que la interacción entre GM_1 y HDL a estos pH, favorece la agregación de alguna de las moléculas o la formación de complejos inestables en medio acuoso, fácilmente removidos por centrifugación. En cambio, la preparación a pHs entre 5,5 y 7,4 beneficia la formación de complejos solubles, estables a la centrifugación.

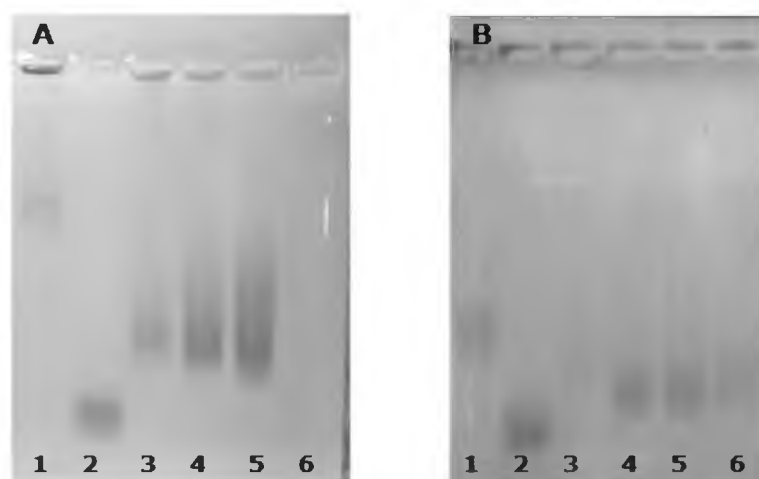


Figura 39: Electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. **A:** Perfiles de migración de micelas de GM_1 incubadas con LDL a diferentes pHs. Los carriles 1-2 corresponde a los estándares de LDL y GM_1 ;

Carril 3-6: GM₁-LDL incubadas a pH 3; 5,5; 7,4 y 10, respectivamente. Micelas de GM₁ [2 mg.ml⁻¹] con LDL [0,24 mg.ml⁻¹]. B: Perfiles de migración de micelas de GM₁ incubadas con HDL a diferentes pHs. Los carriles 1-2 corresponde a los estándares de HDL y GM₁; Carril 3-6: GM₁-HDL incubadas a pH 3; 5,5; 7,4 y 10, respectivamente. Micelas de GM₁ [1mg.ml⁻¹] con LDL [0,14 mg.ml⁻¹].

Por último, se evaluó la influencia de la fuerza iónica, para lo cual se incubó las micelas de GM₁ con LDL o HDL en presencia de cantidades crecientes de NaCl (hasta 1 M), y se observó un aumento en la turbidez de las mezclas proporcional al aumento de la concentración salina. El mismo fenómeno se observó cuando se incubó las LDL o HDL aisladas, lo que sugiere que la fuerza iónica favorece la agregación de las lipoproteínas.

Por otra parte, cuando las micelas fueron incubadas con LDL o HDL en agua o buffers de baja fuerza iónica (< 100mM) la turbidez de las preparaciones fue menor respecto a la LDL o HDL solas, sugiriendo que la estabilidad de los complejos GM₁-Lipo es superior respecto a las Lipo en solución. En este caso, la posterior adición (>2 horas) de cantidades crecientes de NaCl no modificó la turbidez inicial, lo que sugiere la participación de interacciones hidrofóbicas entre ambas moléculas.

Los resultados obtenidos coinciden con datos bibliográficos, donde apuntan a que tanto fuerzas hidrofóbicas como electrostáticas están implicadas en la formación de complejos de gangliósidos-LDL, aunque las primeras parecen ser más importantes [172,174].

6.4.2 Cantidad de LDL o HDL asociada a las micelas de GM₁

Se utilizó la electroforesis en geles de agarosa y el ensayo con la sonda lipofílica Merocianina 540, para determinar la cantidad máxima de LDL o HDL que se puede unir a las micelas de GM₁ o viceversa.

En la fig. 40, se muestra el perfil de migración electroforético obtenido para las mezclas de GM₁-LDL, a diferentes relaciones de masa. Después de incubar cantidades crecientes de GM₁ con una cantidad predeterminada de LDL (fig. 40A) observamos que, hasta relación de masa GM₁/LDL 10/1 (p/p) se observan perfiles de migración de una sola banda, en los cuales la movilidad electroforética cambia en función de la cantidad de micelas en la mezcla. Esto evidencia que las micelas y las LDL migran asociadas en forma de complejo o

agregados. A partir de la relación GM_1/ LDL 20/1 (p/p) se observa además, la aparición de otra banda de migración, que coincide con la migración del GM_1 puro, la cual podría corresponder a micelas libres (en exceso) que no se asociaron con las LDL. Este resultado sugiere que las micelas alcanzan su saturación en la relación GM_1/ LDL 10/1 (p/p).

En la fig. 40B se muestra el perfil de migración obtenido para las mezclas preparadas a partir de una cantidad fija de GM_1 y cantidades crecientes de LDL. En este caso, se observa una curva bifásica, en la cual, a bajas cantidades de LDL en la mezcla (hasta relación GM_1/ LDL 40/1 (p/p), los perfiles presentan dos bandas que migran a distancias parecidas al del GM_1 puro. La banda superior podría corresponder a GM_1 asociado a las LDL y la banda inferior a un exceso de GM_1 en la mezcla, que migra libre (no asociado). A partir de la relación GM_1/ LDL 25/1 (p/p), la banda superior migra cada vez menos respecto al GM_1 puro, mientras que disminuye proporcionalmente la banda inferior. Esto indica que al aumentar la cantidad de LDL, más GM_1 migra asociado con las LDL, y en consecuencia se reduce la cantidad de GM_1 libre (banda inferior).

Ambos ensayos sugieren que la cantidad máxima de LDL asociada a las micelas se alcanza aproximadamente en la relación GM_1/ LDL 10/1 (p/p).

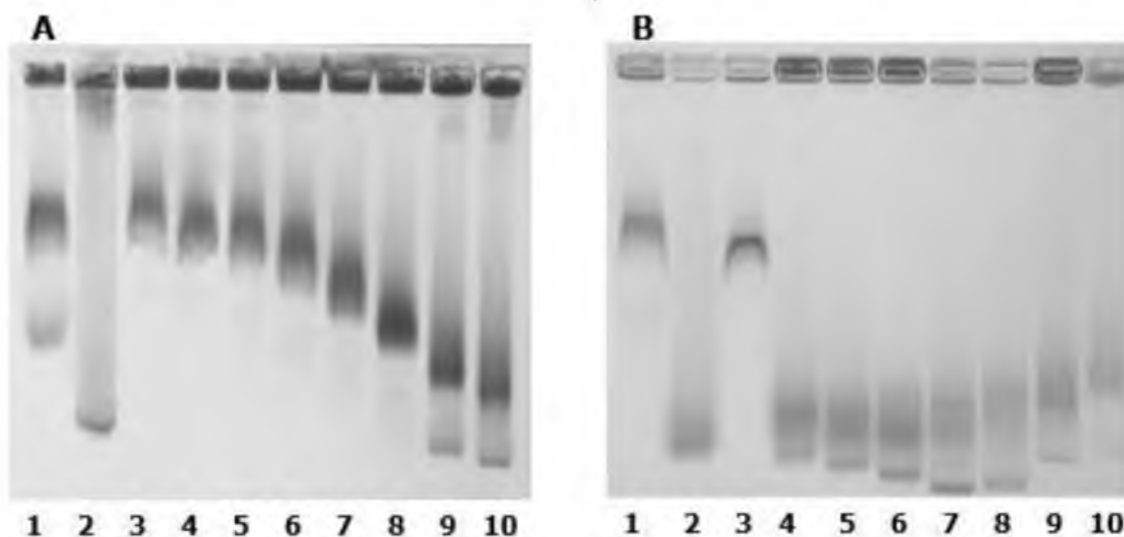


Figura 40: Electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. **A:** Perfiles de migración de LDL incubada con cantidades crecientes de micelas de GM_1 . Los carriles 1-2 corresponde a los estándares de LDL y GM_1 ; Carril 3-10: Relación GM_1/ LDL 0,5/1, 1/1, 2/1, 5/1, 10/1, 20/1 y 40/1 p/p, respectivamente. $[LDL]$: 0,25 mg.mL⁻¹. **B:** Perfiles de migración de micelas de GM_1 incubadas con cantidades crecientes de LDL. Los carriles 1-2 corresponde a los estándares de LDL y GM_1 ; Carril 3-10: Relación GM_1/ LDL 320/1, 160/1, 80/1, 40/1, 25/1, 20/1 y 15/1, respectivamente. Micelas de $[GM_1]$: 10 mg.mL⁻¹.

Asimismo, se realizaron ensayos para determinar la naturaleza de la banda retenida en la posición de siembra de los geles. Se analizó la migración individual de los colorantes utilizados para teñir las micelas y las lipoproteínas. En las fig. 41A-B se muestra la migración del colorante Sudan Black, donde puede observarse que este colorante no migra solo, debido probablemente a su naturaleza hidrofóbica. En cambio, cuando se lo mezcla con el GM₁ o las LDL, una fracción migra asociado hasta la posición característica de cada molécula. Considerando que el colorante se utiliza en exceso, el resultado sugiere que la banda retenida en la posición de siembra corresponde, principalmente, a un exceso de colorante en las muestras. Sin embargo, con este ensayo no se puede descartar la presencia de agregados de LDL o complejos GM₁-LDL insolubles en la banda sin movilidad electroforética.

Cuando utilizamos MC 540, un colorante lipofílico soluble en medio acuoso, para teñir las mezclas de GM₁ y LDL (fig. 41C) también se observó una banda en la posición de siembra, principalmente en el carril correspondiente a la LDL, indicando que la LDL puede agregarse y formar estructuras que no ingresan en el gel. Cuando la LDL interacciona con el GM₁, la banda retenida es variable y, evidentemente, está relacionada con las condiciones de preparación seleccionadas. Anteriormente, se describió como la temperatura, pH y fuerza iónica condicionan la formación de agregados o complejos insolubles, debido probablemente a la influencia de estos parámetros sobre la estructura de la lipoproteína.

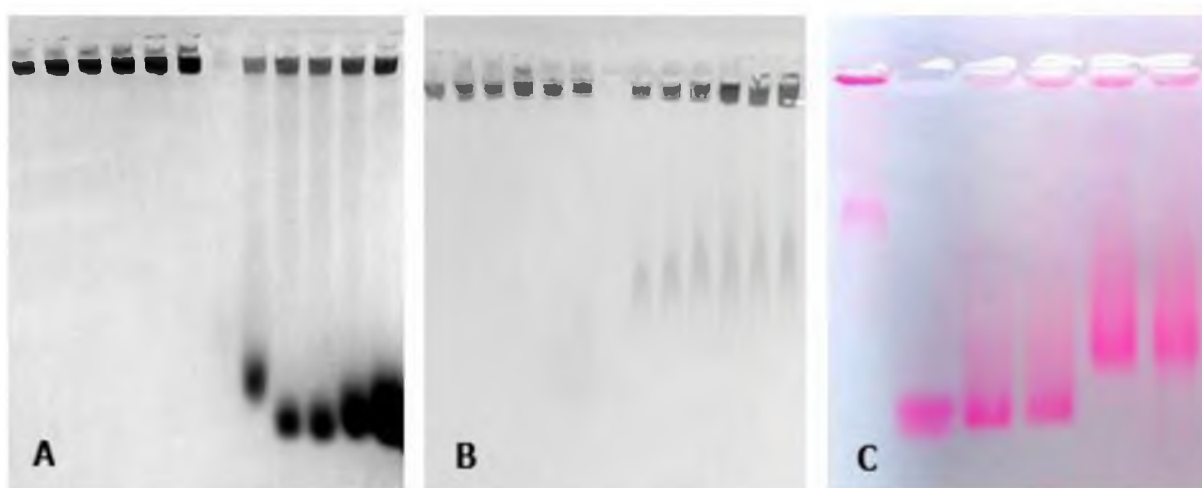


Figura 41: Electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. **A:** Perfiles de migración del colorante Sudan Black y Sudan Black con crecientes de micelas de GM₁. Los carriles 1-6 corresponde a cantidades crecientes de Sudan Black; Carril 8-12: Sudan Black con cantidades crecientes de GM₁. **B:** Perfiles de migración de Sudan Black y Sudan Black con LDL. Los carriles 1-6 corresponde a

cantidades crecientes de Sudan Black; Carril 8-13: Sudan Black con cantidades crecientes de GM_1 .

C: Perfiles de migración del colorante MC 540 con micelas de GM_1 y LDL, en distintas condiciones de preparación. Carril 1: LDL con MC540; Carril 2: GM_1 con MC540; Carriles 3-5: GM_1 -LDL con MC540.

El ensayo con la sonda lipofílica MC 540 también fue utilizado para determinar la cantidad de lipoproteínas unidas a las micelas de GM_1 . Se realizó incubando las micelas con LDL o HDL, previa incorporación de la sonda en la estructura lipoproteica y antes de la precipitación con TCA al 10%. Como se muestra en la fig. 42A, la LDL precipita por completo con el TCA, en cambio, al incrementar progresivamente la concentración de GM_1 en la mezcla, mayor cantidad de LDL permanece en solución, lo que demuestra que la unión a las micelas es lo que las mantiene solubles. Se corroboró así que la asociación óptima entre GM_1 y LDL se alcanza en la relación GM_1 /LDL 10:1 (p/p), y que las soluciones obtenidas son levemente opalescentes. La adición de micelas adicionales conduce a las formulaciones más turbias.

Respecto a la unión GM_1 -HDL, se observó un comportamiento similar a GM_1 -LDL (fig. 42B). El TCA precipitó más del 90% de la HDL cuando el GM_1 no estaba presente, y al aumentar la cantidad de GM_1 , aumenta la HDL en solución, alcanzando su máxima solubilidad, es decir, su máxima unión a las micelas, en la relación GM_1 /HDL 40/1 (p/p). En este caso, el incremento de la relación GM_1 /HDL no modificó la turbidez de las mezclas.

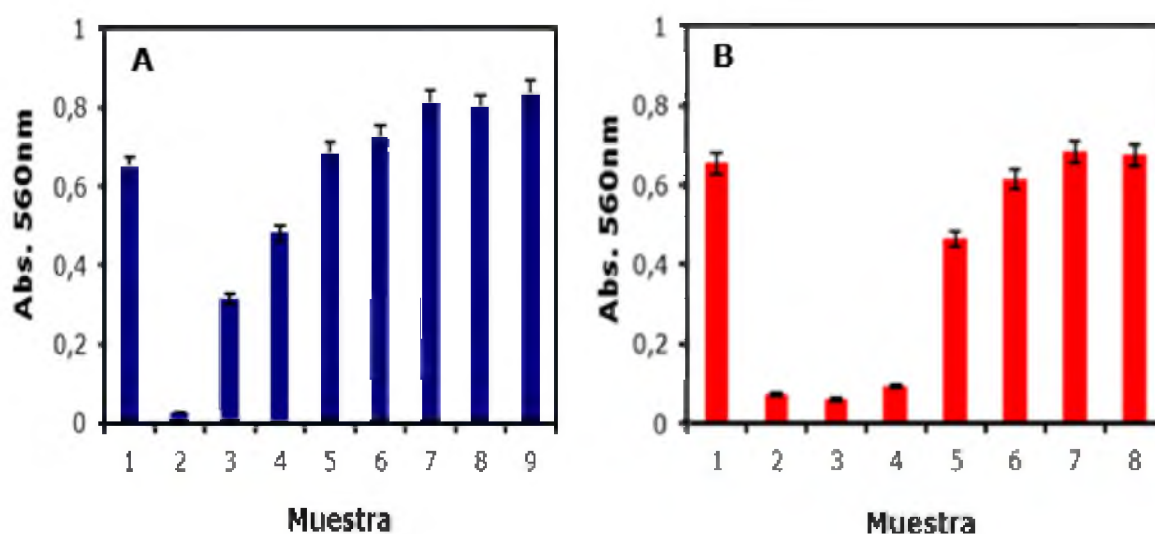


Figura 42: Cuantificación de lipoproteínas solubles asociadas a micelas de GM_1 determinado con MC 540, después de incubar con GM_1 durante 4h a 37°C, precipitar con TCA y clarificar por centrifugación a 10000g. Lectura λ : 560nm. **A:** Carril 1: LDL control sin TCA al 10%, carril 2: LDL con TCA al 10%, carril 3-9: Relación GM_1 /LDL 1/1, 5/1, 10/1, 15/1, 20/1, 40/1 y 80/1,

respectivamente. [LDL]: $0,12\text{mg.ml}^{-1}$. **B:** Carril 1: HDL control sin TCA al 10%, carril 2: HDL con TCA al 10%, carril 3-9: Relación GM_1/HDL 1/1, 5/1, 10/1, 20/1, 40/1 y 80/1, respectivamente. [HDL]: $0,1\text{ mg.ml}^{-1}$. Las barras de error indica la DS de la media ($n=3$)

6.4.3 Preparación de complejos solubles de GM_1 -LDL o GM_1 -HDL cargados con Ptx o Doxo

A continuación, se evaluó la capacidad de los complejos GM_1 -lipo para incorporar fármacos como Ptx o Doxo. Con Ptx se observó que puede ser incorporado dentro del complejo GM_1 -lipo ya formado con la misma eficiencia de carga que las micelas de GM_1 puras. Igualmente, el Ptx se mantuvo soluble cuando fue incorporado en las micelas previo a la unión con la LDL (Tabla VIII).

Tabla VIII: Incorporación de Ptx en micelas de GM_1 previamente incubadas con LDL y con micelas de GM_1 antes de ser incubadas con LDL, a distintas relaciones de masas GM_1/LDL . Relación molar GM_1/Ptx 5/1. Preparación a 37°C

Relación de masa GM_1/LDL (p/p)	Ptx soluble (%)	
	$\text{GM}_1/\text{LDL}/\text{Ptx}$	$\text{GM}_1/\text{Ptx}/\text{LDL}$
40/1	97	98
20/1	94	98
10/1	96	97
5/1	95	94

Sin embargo, se observó una diferencia significativa en la estabilidad de los complejos obtenidos según el orden de preparación utilizado. Cuando el Ptx fue incorporado en el complejo GM_1 -LDL ya formado, permaneció soluble durante 48hs a 37°C , mientras que el cargado en las micelas de GM_1 , previo a la incubación con las LDL, fue estable por más de 15 días, sin afectar la cantidad de LDL unida (fig. 43).

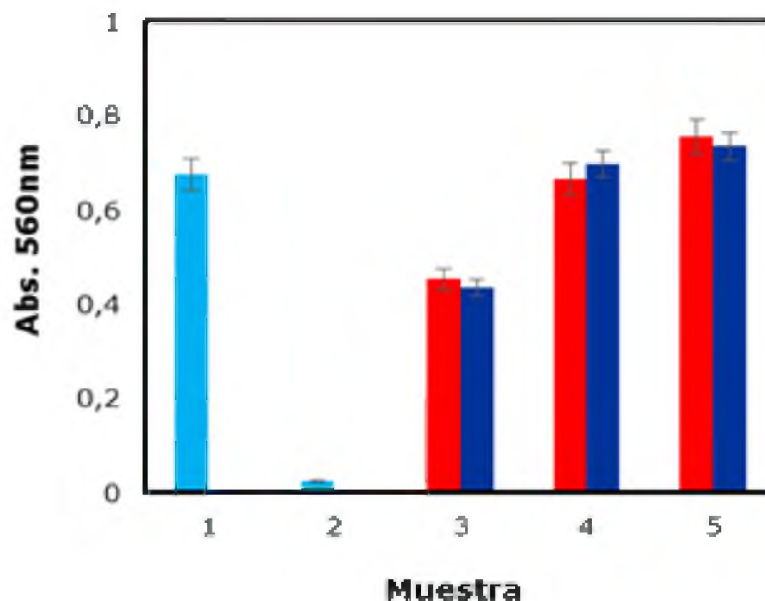


Figura 43: Cuantificación de la LDL asociada a micelas de GM_1 y micelas de GM_1/Ptx , después de 15 días de la preparación. Medición espectrofotométrica de la sonda MC 540 incorporada en la LDL, incubada con GM_1 o GM_1/Ptx durante 4h a 37°C, precipitada con TCA y clarificada por centrifugación a 10000g. Carril 1: LDL control sin TCA al 10%, carril 2: LDL con TCA al 10%, carril 3-5: Relación GM_1/LDL 5/1, 10/1 y 20/1, respectivamente. (■) LDL incubada con GM_1/Ptx , (■) LDL incubada con GM_1 . Relación GM_1/Ptx 5/1 mol/mol. Lectura λ : 560nm. Las barras de error indica la DS de la media (n=3).

Por otra parte, y considerando que la temperatura condiciona la interacción entre las micelas de GM_1 y las lipoproteínas, se evaluó la influencia de esta variable sobre la incorporación de Ptx en los complejos GM_1 -lipo.

Para ello, primero se cargaron las micelas de GM_1 con Ptx (GM_1/Ptx 5/1 mol/mol); previo a la incubación con las LDL a 4, 20, 37 y 55°C durante 2 h y 24 h de reposo a 20°C. Luego, se cuantificó el Ptx cargado y se evaluó la estabilidad del complejo. Puede verse en la fig. 44, que la incubación a 55°C redujo notablemente la cantidad de Ptx soluble. En esta condición, la carga máxima de Ptx se alcanzó en la relación GM_1/Ptx 20/1 mol/mol, muy inferior a la 5/1 correspondiente a las micelas de GM_1 puras. El resultado está estrechamente relacionado con trabajos previos que muestran que el calentamiento produce una desestabilización muy marcada de las micelas, aún en presencia de Ptx, el cual es capaz de estabilizarlas cuando son formadas a temperatura ambiente [80].

La incubación a 4, 20 y 37°C no afecta la incorporación del fármaco, sin embargo, y considerando que a 4 y 20°C, la cantidad de LDL que se une a las micelas es baja, podemos indicar que la condición más favorable para obtener

complejos ternarios estables; con la mayor cantidad de LDL unida y Ptx incorporado, se consigue preparando el complejo a 37°C.

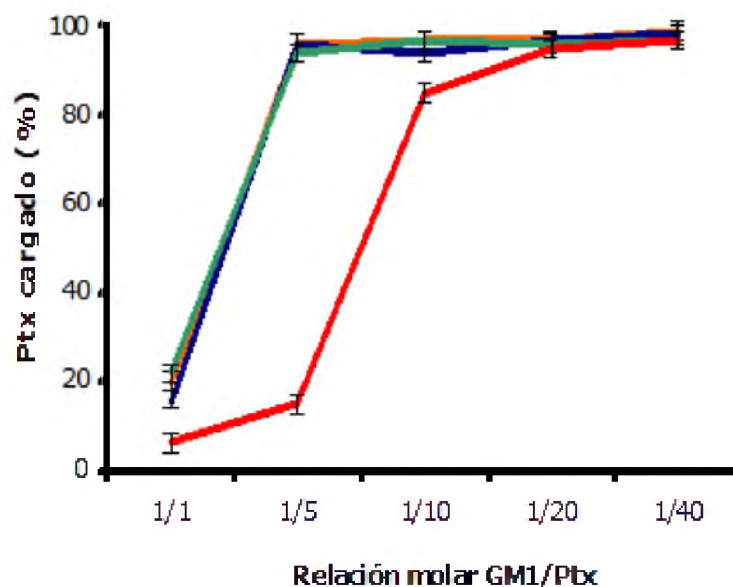


Figura 44: Incorporación de Ptx en los complejos GM₁-LDL preparados a distintas temperaturas. 4°C (—), 20°C (—), 37°C (—) y 55°C (—). Las barras de error indican la DS de la media (n=3). La cuantificación se realizó a las 24hs posterior a la preparación

En la fig. 45 se muestra la influencia de la temperatura sobre la carga de Ptx en los complejos GM₁/Ptx-HDL. Puede observarse que, a mayor temperatura de incubación, menor cantidad de Ptx se mantuvo soluble en el complejo. Si bien la temperatura no afectó directamente la incorporación del Ptx, influyó sobre la estabilidad de la formulación, observándose Ptx insoluble a las 24 horas. Esto se debe probablemente, a una reorganización interna del complejo GM₁-HDL causada por la temperatura, que lleva a la exclusión del fármaco.

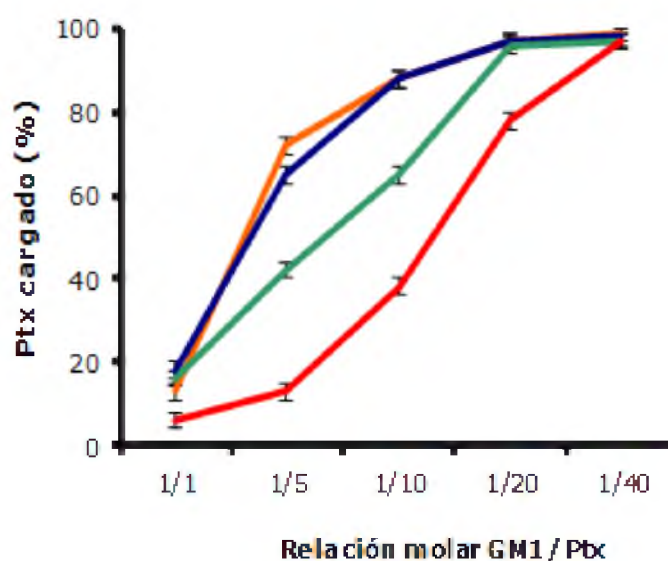


Figura 45: Incorporación de Ptx en los complejos GM₁-HDL preparados a distintas temperaturas. 4°C (—), 20°C (—), 37°C (—) y 55°C (—). Las barras de error indican la DS de la media (n=3). La cuantificación se realizó a las 24hs posterior a la preparación

En conjunto, los resultados demuestran que es posible preparar y obtener complejos ternarios GM₁/Ptx-LDL o GM₁/Ptx-HDL, siendo los complejos GM₁-LDL los que ofrecen mayor capacidad de carga y estabilidad física.

Para evaluar la cantidad de Doxo incorporada en los complejos GM₁-lipo, se utilizó la cromatografía de exclusión por tamaño. En la fig. 46 se muestra los perfiles de elución de GM₁-LDL con diferentes cantidades de Doxo. Se observa que, hasta la relación molar GM₁/Doxo 10/1, el 100% de la Doxo adicionada al medio eluye con el volumen V₀ (fracción no-retenida) de la columna. Considerando que el complejo GM₁-LDL (PM > 200KDa) eluye con el volumen V₀ de la columna y la Doxo a un volumen de aproximadamente 28 ml, el resultado demuestra que la Doxo eluye asociada al complejo.

A partir de la relación molar 5/1 GM₁/Doxo, una parte del fármaco eluye con el volumen V₀ y otra fracción superpuesta al perfil de la Doxo, indicando que el sistema GM₁-LDL alcanzó su máxima capacidad de carga. Comparado a las micelas de GM₁, el complejo demuestra tener menor capacidad para incorporar Doxo.

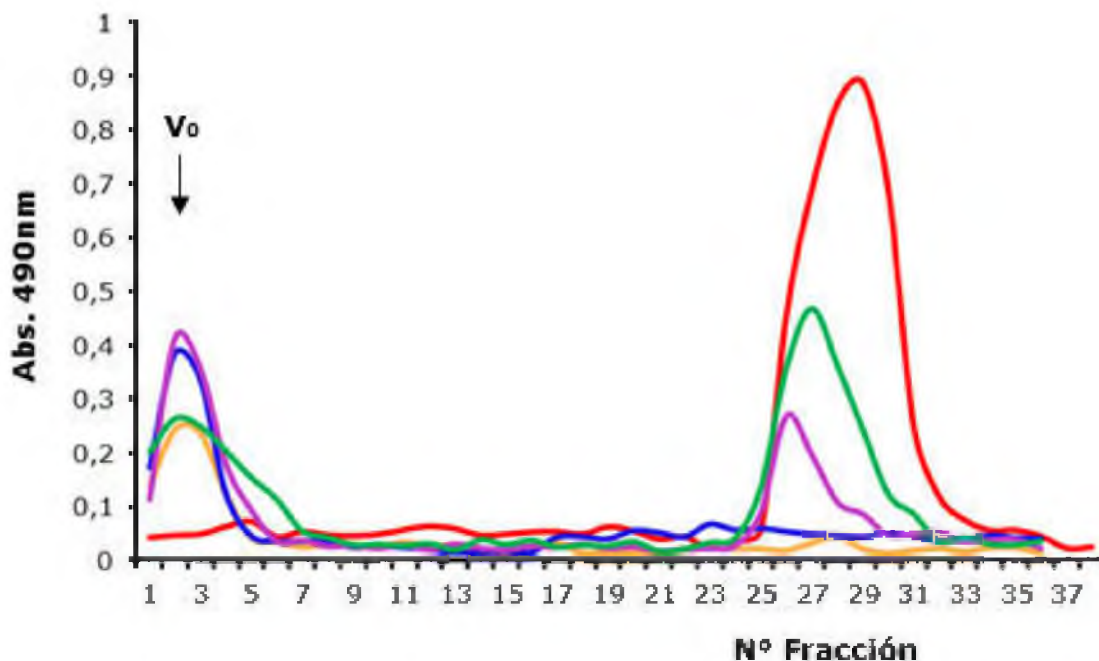


Figura 46: Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de GM_1 -LDL con diferentes cantidades de Doxo. Cromatografía en Superdex G-200® de Doxo (—) y GM_1 -LDL/Doxo a: 15/1 (—); 10/1 (—); 5/1 (—) y 2,5/1 (—) relaciones molares (GM_1 /Doxo). Relación GM_1 /LDL 20/1 (p/p).

Por otra parte, la incorporación de Doxo en el complejo GM_1 -HDL dio lugar a formulaciones turbias, con presencia de grumos o agregados, que precipitaron por decantación.

6.4.4 Caracterización de los complejos GM_1 -lipo

La caracterización de las partículas de GM_1 y las LDL fue realizada por medio de un DLS y microscopía electrónica de transmisión y se seleccionaron las micelas de GM_1 con la máxima cantidad de LDL unida. En la Tabla IX se muestran los resultados, que incluyen diámetro medio, IP y potencial zeta. Las partículas de GM_1 -LDL tuvieron un diámetro medio de $105,7 \pm 4,2$ con un IP de $0,317 \pm 0,009$. Un tamaño muy superior respecto a la suma de las moléculas individuales y un IP relativamente alto, lo que indica una distribución no uniforme de la población.

Respecto al potencial zeta de los complejos GM_1 -LDL, se evidenció un marcado aumento en la electronegatividad superficial que, al igual que el diámetro de partícula, fue mayor que la suma de sus componentes individuales. Los resultados obtenidos sugieren la participación de varias moléculas en la

formación de los complejos GM_1 -LDL, lo que concuerda con resultados de otros autores que demuestran que cantidades elevadas de gangliósidos pueden asociarse con la LDL y que los complejos formados son, en promedio, 2-3 veces más grandes que las partículas de LDL nativas [174]. Además, sugieren que las moléculas de ácido siálico de los gangliósidos, cargadas negativamente, se distribuyen en la superficie de la lipoproteína cuando se asocian, mientras que la mayoría de los grupos no polares quedan contenidos en el interior [175].

Tabla IX: Características fisicoquímicas de las LDL, micelas de GM_1 y micelas de GM_1 asociadas con LDL. GM_1 (10mg/ml); GM_1 /LDL 20/1 p/p. *Datos de bibliografía

Muestra	Diámetro (nm)	Índice de Polidispersidad (P.I)	Potencial Zeta (mV)	Desviación estándar
GM_1	14,7	0.158	-8,6	1.5
*LDL	20-25	0.299	-25.2	1.0
GM_1 /LDL	105.7	0.317	-55.91	0.54

Las imágenes obtenidas por TEM (fig. 47) muestran una distribución de tamaño no uniforme de los complejos de GM_1 -LDL, pero a diferencia de los resultados del DSC, los diámetros de partícula no superan los 100nm.

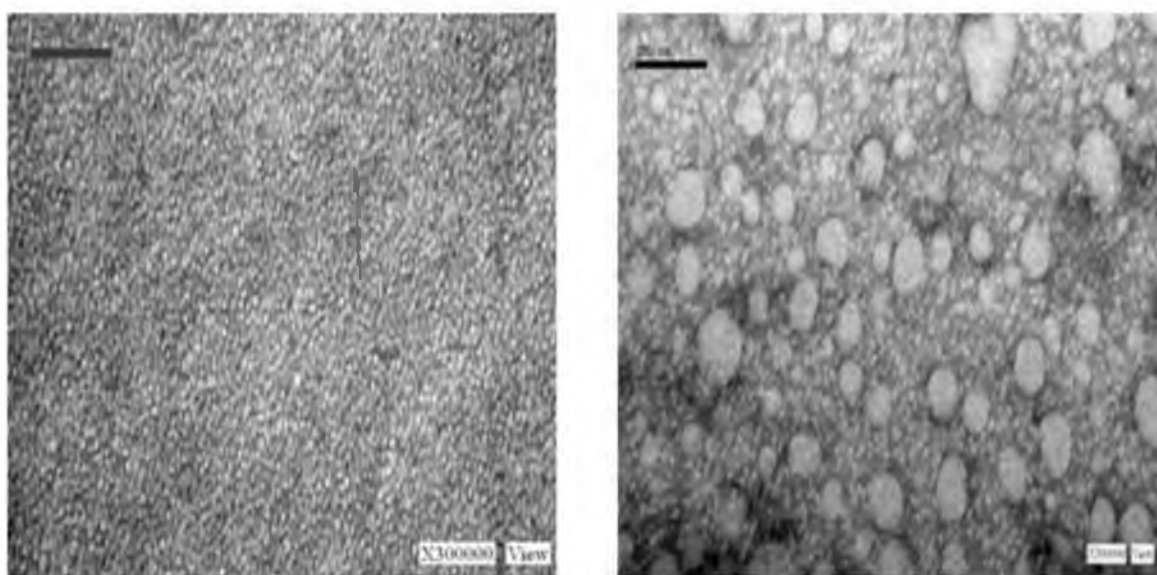


Figura 47: Micrografía electrónica de: (A) micelas de GM_1 y (B) micelas de GM_1 modificadas con LDL. El tamaño de barra es de 100 nm. Aumento 300000X

6.4.5 Efecto citotóxico *in vitro* de los complejos GM₁-LDL/fármaco.

Teniendo en cuenta que los complejos ternarios de GM₁-HDL/fármaco demostraron ser inestables y muy variables en su composición, los ensayos de citotoxicidad se realizaron con los complejos GM₁-LDL/fármaco. Se utilizó para estos estudios el ensayo cristal violeta, como se describió en la sección Métodos.

Primero se evaluó el efecto citotóxico de la Doxo cargada en los complejos GM₁-LDL, sobre la línea celular Hep-2 y se lo comparó a la Doxo cargada en las micelas de GM₁. Se midió la viabilidad celular después de incubar las formulaciones a cortos períodos de tiempo ya que, la captación celular de la Doxo desde las micelas de GM₁ es relativamente rápida (fig. 48).

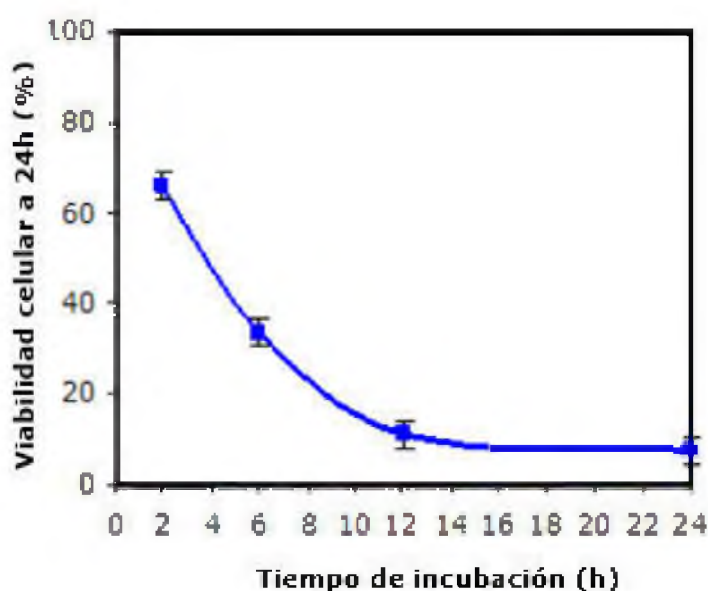


Figura 48: Efecto citotóxico *in vitro* de las micelas de GM₁/Doxo (■) sobre células Hep-2 después de 2, 6, 12 y 24 horas de incubación. [Doxo]_{efec} de 10 µg.mL⁻¹. Las barras de error indica la DS de la media (n=5)

Se observó que el complejo GM₁-LDL no posee toxicidad celular, lo que permite considerarlo un nanotransportador biocompatible (fig. 49). Por otra parte, se evidenciaron diferencias significativas en la citotoxicidad de las muestras, siendo mayor la de GM₁-LDL/Doxo en comparación con las de GM₁/Doxo. Esto refleja diferencias en la captación de las formulaciones, probablemente relacionadas con la presencia de LDL.

Los resultados presentados concuerdan con lo observado previamente en el microscopio fluorescente, en el cual se observó mayor fluorescencia (propia de la

Doxo) cuando las células fueron tratadas con GM₁-LDL/Doxo, después de 2 y 3 horas de incubación.

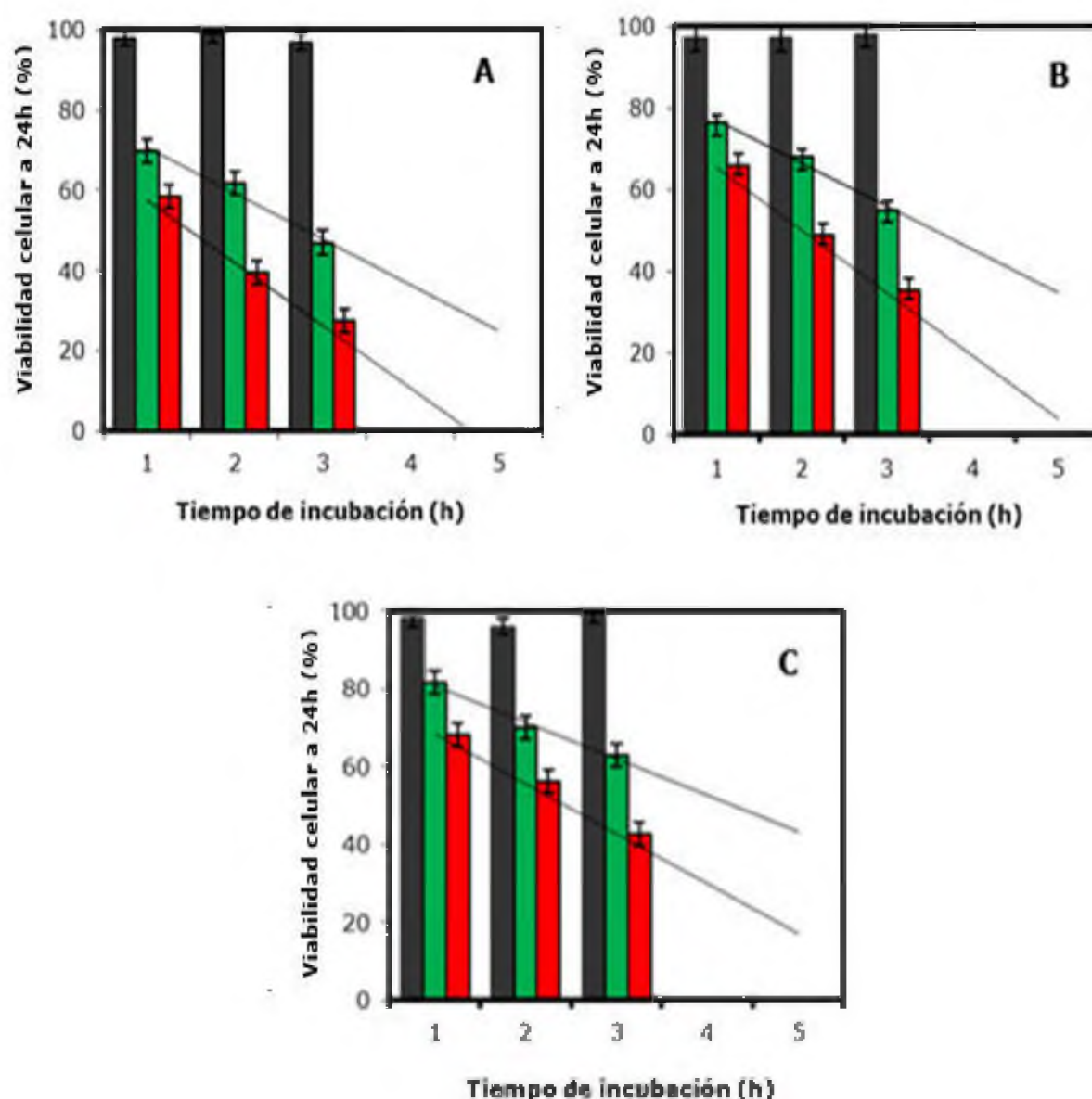


Figura 49. Efecto citotóxico *in vitro* de GM₁-LDL (■), GM₁/Doxo (■) y GM₁-LDL/Doxo (■) sobre células Hep-2 después de 1, 2 y 3 h de incubación. **A:** [Doxo]_{efec} de 25 µg.ml⁻¹; **B:** [Doxo]_{efec} de 10 µg.ml⁻¹; **C:** [Doxo]_{efec} de 5 µg.ml⁻¹. Las barras de error indica la DS de la media (n=5)

Diferencias similares también fueron observadas a tiempos de incubación más largos con concentraciones de Doxo más bajas (fig. 50), lo que permitiría reducir la dosis y minimizar el daño a los tejidos sanos circundantes.

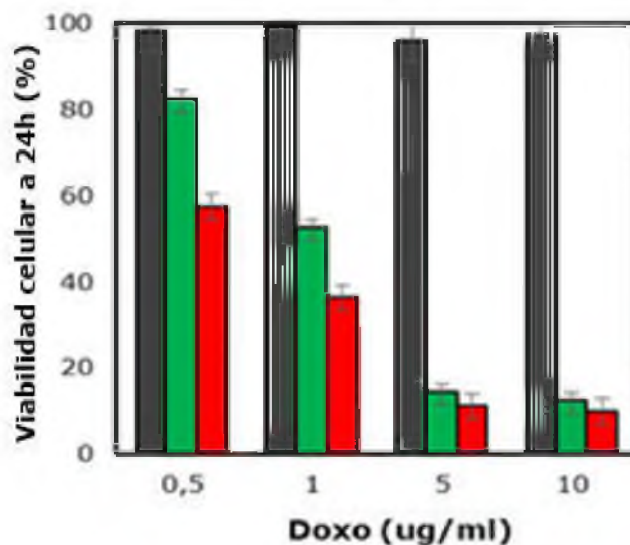


Figura 50: Efecto citotóxico *in vitro* de GM₁-LDL (■), GM₁-Doxo (■) y GM₁-LDL/Doxo (■) sobre células Hep-2 después de 8 h de incubación. [Doxo]_{efec} de 0,5, 1, 5 y 10 ug.ml⁻¹. Las barras de error indica la DS de la media (n=5)

Del mismo modo, se evaluó el efecto citotóxico del Ptx cargado en el complejo GM₁/Ptx-LDL sobre la línea celular Hep-2. Se observó, al igual que la Doxo, mayor muerte celular cuando las células fueron tratadas con GM₁-Ptx/LDL, lo que demuestra la influencia de la LDL en la captación del complejo (fig.51). Por otra parte, los resultados confirman lo observado en el microscopio (fig. 52).

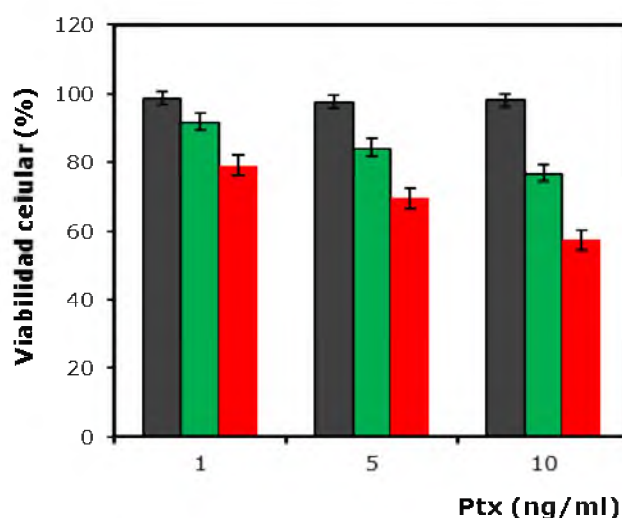


Figura 51: Efecto citotóxico *in vitro* de GM₁-LDL (■), GM₁/Ptx (■) y GM₁/Ptx-LDL (■) sobre células Hep-2 después de 24 h de incubación. [Ptx]_{efec}: 1, 5 y 10 ng.ml⁻¹. Las barras de error indica la DS de la media (n=5).

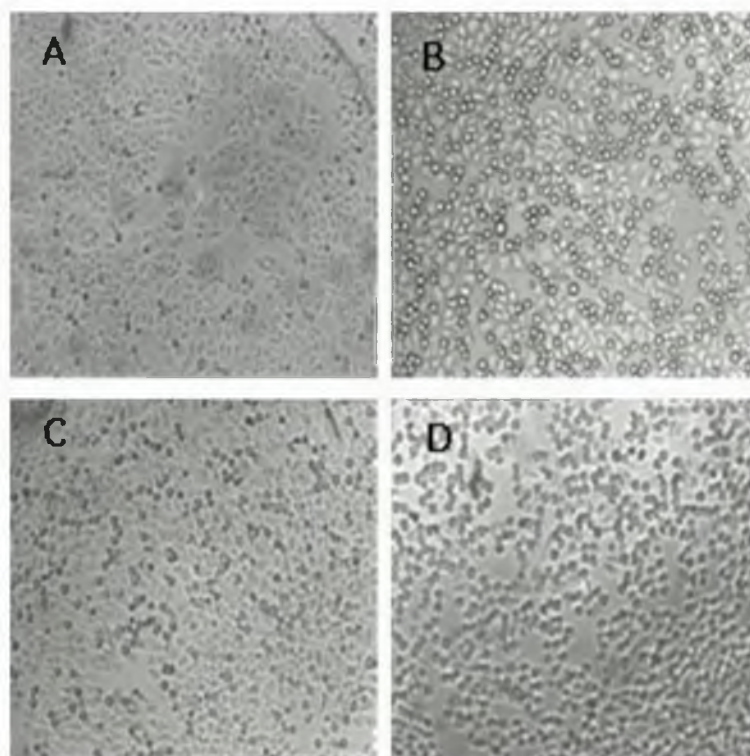


Figura 52: Imágenes obtenidas por microscopía óptica del efecto citotóxico *in vitro* del Ptx cargado en GM_1 /Ptx y GM_1 /Ptx-LDL sobre células Hep-2 después de 24 h de incubación. **A:** GM_1 -Ptx con $[Ptx]_{efec}$ $1ng.ml^{-1}$. **B:** GM_1 -Ptx-LDL con $[Ptx]_{efec}$ de $1ng.ml^{-1}$. **C:** GM_1 /Ptx con $[Ptx]_{efec}$ $10ng.ml^{-1}$. **D:** GM_1 /Ptx-LDL con $[Ptx]_{efec}$ de $10ng.ml^{-1}$.

Los resultados obtenidos con células HeLa fueron similares a aquellos obtenidos para Hep-2. Ambos fármacos mostraron mayor citotoxicidad cuando fueron transportados por los complejos GM_1 -LDL/fármaco, lo que sugiere con mayor evidencia que la presencia de LDL en el complejo modifica la captación de las micelas de GM_1 .

A continuación, se evaluó la citotoxicidad de la formulación GM_1 -LDL/Doxo sobre las células Hep-2 a 4 y 37°C, con el fin de establecer la participación de mecanismos activos, dependientes de energía, involucrados en la captación de los complejos. Para ello, se determinó la viabilidad de las células después de incubarlo con GM_1 -LDL/Doxo a distintos tiempos y concentraciones de Doxo. Los resultados de la fig. 53A muestran diferencias significativas en la muerte celular entre las temperaturas evaluadas, lo que sugiere que la captación de GM_1 -LDL/Doxo estaría mediada por mecanismos de transporte activo. Previamente [81], ya habíamos propuesto la participación de mecanismos dependientes de energía en la captación tanto de Doxo libre, como de la proveniente del sistema GM_1 -Doxo. En función de esto, comparamos la

citotoxicidad de GM₁/Doxo y GM₁-LDL/Doxo después de incubarlas con las células Hep-2 a 4 y 37°C para determinar si el mecanismo involucrado en la captación de GM₁-LDL/Doxo es el mismo que describimos antes para GM₁/Doxo u algún otro relacionado a las LDL. Así, se observaron diferencias significativas en la muerte celular producida por GM₁/Doxo a 37°C respecto a 4°C, lo que refuerza la idea de un mecanismo de transporte activo vinculado a la captación celular del sistema GM₁/Doxo (fig. 53B). Asimismo, se observó diferencias en la viabilidad celular entre GM₁/Doxo y GM₁-LDL/Doxo después de incubarlas a 37°C, lo que revela la participación de otro mecanismo, también activo, vinculado seguramente a la presencia de LDL.

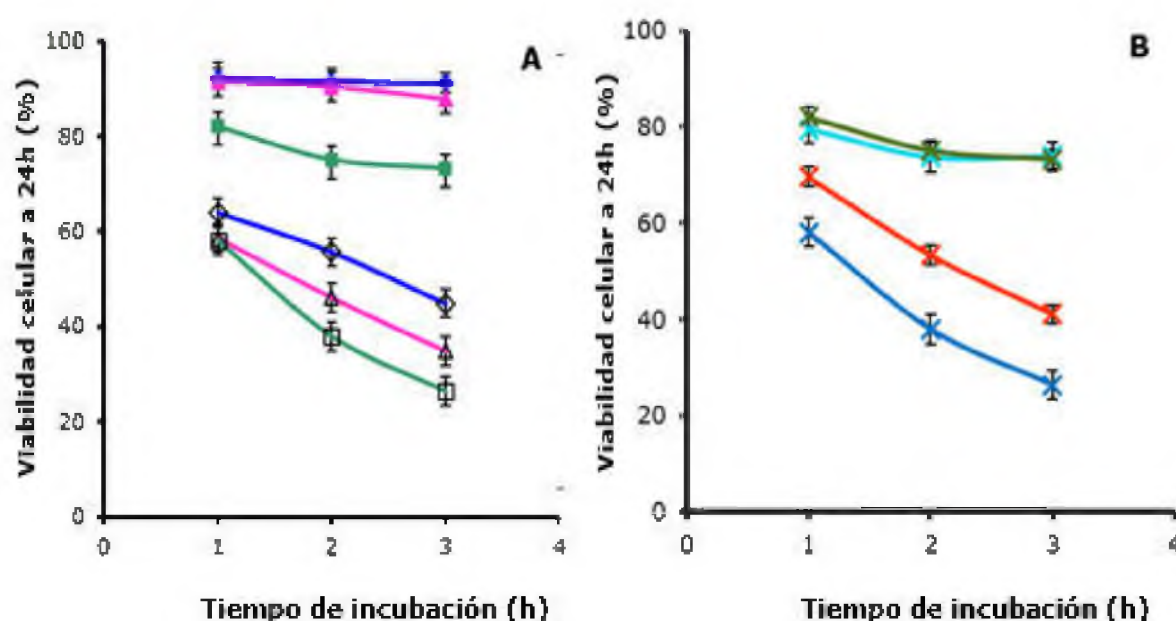


Figura 53: Efecto citotóxico in vitro de GM₁/Doxo y GM₁-LDL/Doxo después de 1, 2 y 3 h de incubación sobre células Hep-2, en dos condiciones de temperatura. **A:** GM₁-LDL/Doxo con una [Doxo]_{efec} de: 25µg.ml⁻¹ a 4°C (■), 25µg.ml⁻¹ a 37°C (□), 10µg.ml⁻¹ a 4°C (▲), 10µg.ml⁻¹ a 37°C (△), 5µg.ml⁻¹ a 4°C (◆) y 5µg.ml⁻¹ a 37°C (◇). **B:** GM₁/Doxo a 4°C (✱), GM₁-LDL/Doxo a 4°C (✧), GM₁/Doxo a 37°C (✶) y GM₁-LDL/Doxo a 37°C (✦). [Doxo]_{efec} de: 25µg.ml⁻¹. Las barras de error indica la DS de la media (n=5)

Además, y considerando que en numerosos estudios se describe la captación celular de la LDL vía su receptor específico, como un proceso regulado y saturable, en el cual la síntesis y actividad del receptor está controlada de manera eficiente por el nivel de colesterol así como por la presencia de LDL en el medio [159,160,177,178], se evaluó el comportamiento del complejo GM₁-LDL/Doxo en presencia de LDL en el medio. En primer lugar, se determinó la

viabilidad de las células Hep-2 tratadas con la formulación y con GM₁/Doxo, después de preincubarlas con un exceso de LDL.

Los resultados revelan un incremento significativo en la actividad citotóxica del sistema GM₁/Doxo, igualando al producido por el complejo GM₁-LDL/Doxo. Esto puede ser resultado de la unión del complejo GM₁/Doxo con las LDL de la preincubación con las células, para formar el complejo GM₁-LDL/Doxo, lo que facilitaría de ese modo la captación del complejo (fig. 54). Resultados similares se observaron con las demás concentraciones de Doxo evaluadas.

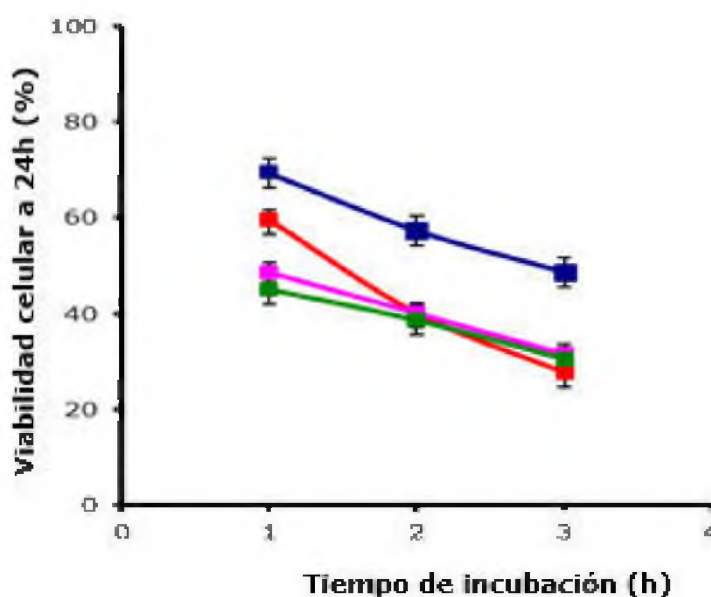


Figura 54: Efecto citotóxico *in vitro* de GM₁/Doxo y GM₁-LDL/Doxo después de 1, 2 y 3 h de incubación sobre células Hep-2, preincubadas durante 4h con LDL [0,24 mg.mL⁻¹]. GM₁/Doxo (■), GM₁-LDL/Doxo (■), GM₁-LDL/Doxo con preincubación de LDL (■) y GM₁/Doxo con preincubación de LDL (■). La concentración de [Doxo]_{efec}: 25µg.mL⁻¹. Las barras de error indica la DS de la media (n=5)

A continuación, se determinó la viabilidad de las células Hep-2 tratadas con GM₁-LDL/Doxo y con GM₁/Doxo, coincubadas con un exceso de LDL. Al igual que la preincubación, no se observó diferencias significativas en las curvas de actividad del fármaco entre ambas formulaciones (fig. 55A). Nuevamente, se evidencia un incremento en la actividad de GM₁/Doxo, igualando al producido por el complejo GM₁-LDL/Doxo. Incluso, la actividad del complejo GM₁-LDL/Doxo aumentó levemente cuando se coincubó con LDL.

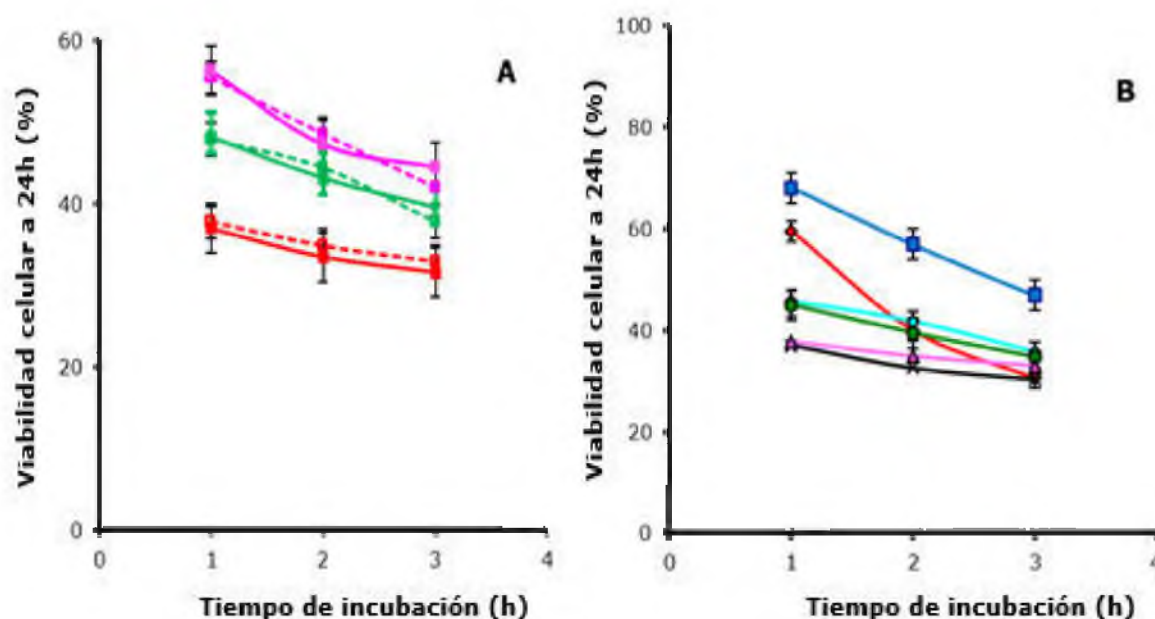


Figura 55: Efecto citotóxico *in vitro* de GM₁/Doxo y GM₁-LDL/Doxo después de 1, 2 y 3 h de incubación sobre células Hep-2, coincubadas con LDL [0,24 mg.ml⁻¹]. **A:** GM₁-LDL/Doxo (—■—) y GM₁/Doxo (··■··) con una [Doxo]_{efec} de: 5µg.ml⁻¹, GM₁-LDL/Doxo (—■—) y GM₁/Doxo (··■··) con una [Doxo]_{efec} de: 10µg.ml⁻¹, GM₁-LDL/Doxo (—■—) y GM₁/Doxo (··■··) con una [Doxo]_{efec} de: 25µg.ml⁻¹. **B:** GM₁/Doxo (—■—), GM₁-LDL/Doxo (—◆—), GM₁-LDL/Doxo con preincubación de LDL (—◆—) y GM₁/Doxo con preincubación de LDL (—●—), GM₁-LDL/Doxo coincubadas con LDL (—★—) y GM₁/Doxo coincubadas con LDL (—▲—). [Doxo]_{efec} de: 25µg.ml⁻¹. Las barras de error indica la DS de la media (n=5)

En conjunto, los resultados sugieren que en condiciones favorables (37°C y medio adecuado), la LDL puede unirse fácilmente al complejo GM₁-Doxo, facilitando su captación, ya sea vía receptor de LDL u otro tipo de mecanismo. Sin embargo, no permiten confirmar la participación del RLDL en la captación del complejo GM₁-LDL/Doxo.

Por último, se evaluó el efecto citotóxico de GM₁-LDL/Doxo sobre la línea celular no tumoral Vero a las concentraciones que mostraron efecto sobre las líneas tumorales. En este caso, la actividad del complejo no mostró diferencias significativas respecto a GM₁/Doxo y la Doxo en solución. La concentración de Doxo utilizada, efectiva sobre células tumorales, prácticamente no afectó el crecimiento celular (fig. 56). Resultados similares se observaron después de 24 h de incubación.

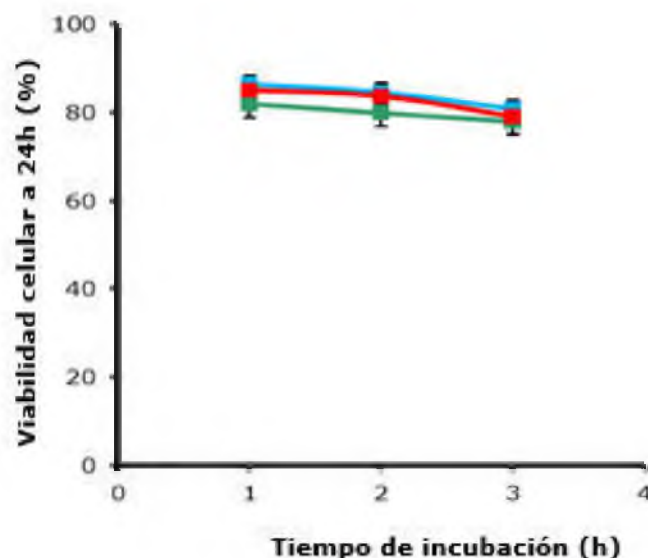


Figura 56: Efecto citotóxico *in vitro* de Doxo (■), GM₁/Doxo (■) y GM₁-LDL/Doxo (■) sobre células Vero después de 1, 2 y 3 h de incubación. [Doxo]_{efec} de 25µg.mL⁻¹. Las barras de error indica la DS de la media (n=5)

6.4.6 Efecto de la liofilización

Uno de los inconvenientes que presenta el uso de lipoproteínas nativas es su baja estabilidad acuosa. Además, se oxidan fácilmente y son susceptibles a sufrir pequeños cambios estructurales, principalmente la apolipoproteína, que afecta el posterior reconocimiento y unión a sus receptores específicos. Con el objetivo de preservar sus propiedades fisicoquímicas en el tiempo, se liofilizó la formulación GM₁-LDL/Doxo y GM₁-LDL/Ptx y se evaluó su efecto citotóxico después de 4 meses de almacenamiento y resolubilización. Puede observarse en la fig. 57, que el proceso de liofilización no modificó la citotoxicidad de la formulación, lo que demuestra que los complejos pueden ser almacenados en estado sólido por largos periodos de tiempo, sin alterar sus propiedades fisicoquímicas. Resultados similares fueron obtenidos con la formulación GM₁-Ptx/LDL.

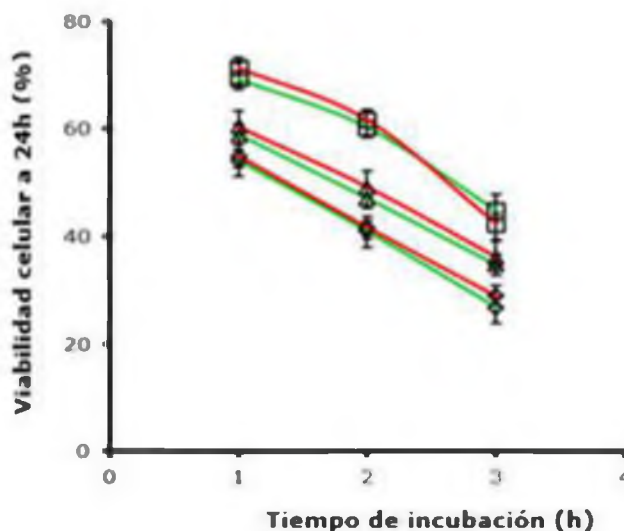


Figura 57: Efecto citotóxico *in vitro* de GM₁-LDL/Doxo preparada en el día (—) y GM₁-LDL/Doxo liofilizada, almacenada durante 4 meses a 4°C y reconstituida antes de usar (—) sobre células Hep-2 después de 1,2 y 3 h de incubación. [Doxo]_{efec} de 5 µg.mL⁻¹ (□), 10 µg.mL⁻¹ (△) y 25 µg.mL⁻¹ (◇). Las barras de error indica la DS de la media (n=5)

6.5 Discusión

Hace más de tres décadas que las lipoproteínas fueron propuestas como una potencial estrategia para el transporte de fármacos [161,179,180], en las cuales se pueden incorporar agentes anticancerígenos y administrarlos específicamente a células cancerosas. Con los años, muchos grupos han intentado formular diversos fármacos (como doxorrubicina, vincristina y paclitaxel, entre otros) con estas estructuras, aunque, en general, han demostrado tener mala estabilidad, la integridad de la apolipoproteína se ve alterada y la eficiencia de carga es baja. En este estudio, se propuso un enfoque alternativo para la terapia del cáncer mediada por lipoproteínas. En lugar de incorporar fármacos oncológicos en las lipoproteínas, se planeó unirlos a micelas de GM₁, un nanotransportador de demostrada eficacia para el transporte de fármacos oncológicos [80,81,105], con el objetivo de reunir las potencialidades de cada componente en un mismo sistema.

Los resultados descriptos en este capítulo demuestran que las micelas de GM₁ son capaces de interaccionar y formar complejos solubles GM₁-LDL y GM₁-HDL, por simple incubación de las micelas de GM₁ con las fracciones purificadas de lipoproteínas. Además, se demostró que la interacción entre las micelas y las

Lipo es altamente dependiente de condiciones como la temperatura, pH y fuerza iónica. La interacción se favorece a medida que aumenta la temperatura, resultando en mayor cantidad de complejos solubles. Sin embargo, y considerando que las apolipoproteínas, en general, sufren cambios estructurales a partir de los 50°C, afectando su funcionalidad, no resulta conveniente utilizar temperaturas elevadas. Por ello, la condición más favorable se obtiene incubando las moléculas a 37°C y un pH entre 5,5 y 7,5, debido a que pH más extremos (3, 10) favorecen la agregación y formación de complejos insolubles. Del mismo modo, el aumento de la fuerza iónica del medio produce mayor turbidez y precipitación de las mezclas, principalmente, por agregación de las lipoproteínas. En conjunto, los resultados observados sugieren, en concordancia con datos bibliográficos [172,174], que tanto fuerzas hidrofóbicas como electrostáticas están implicadas en la formación de estos complejos gangliósidos-lipoproteínas, pero las primeras parecen ser más importantes. En la condición más favorable se puede obtener complejos GM₁-LDL solubles, hasta una relación 10/1 (p/p) y GM₁-HDL hasta 40:1 (p/p).

También se demuestra que los complejos GM₁-LDL son capaces de cargar Ptx, hasta una relación molar GM₁/Ptx de 5/1, originando complejos ternarios GM₁-LDL/Ptx que, sin embargo, debe respetar un orden específico de preparación para obtener complejos GM₁-LDL/Ptx estables en medio acuosos. La unión de LDL a las micelas, previamente cargadas con Ptx, son más estables (> 15días), debido probablemente a una mejor localización del Ptx en el interior hidrofóbico de las micelas. También se evidenció que los complejos GM₁-LDL pueden cargar Doxo, hasta una relación molar GM₁/Doxo de 10/1, levemente inferior a la capacidad de las micelas vacías (relación GM₁/Doxo 5:1 mol/mol), lo que demuestra poca influencia de la LDL en la carga de este fármaco en las micelas. Por otra parte, los complejos formulados de GM₁-HDL, demostraron tener menor capacidad para cargar Ptx o Doxo, independientemente del orden de preparación, y muy baja estabilidad en medios acuosos, motivo por el cual, los estudios de caracterización, así como los ensayos de citotoxicidad se realizaron con los complejos GM₁-LDL/fármaco.

Los estudios por DLS revelaron que los complejos GM₁-LDL presentan un diámetro medio de 105,7nm, aproximadamente 4 veces más grande respecto a las LDL nativas. Este resultado no difiere mucho de otros autores, adonde se demuestra que cantidades relativamente altas de gangliósidos pueden asociarse

con la LDL y que los complejos resultantes son en promedio 2-3 veces más grandes que las partículas de LDL nativas [174].

El aumento del diámetro de partícula fue acompañado de una distribución de tamaños más amplia, lo que indica una población más heterogénea después de la formación del complejo; resultado confirmado por TEM. Además, los resultados mostraron que los complejos GM₁-LDL presentan una elevada carga superficial electronegativa (-55,9 mV), la cual probablemente contribuye a la mayor estabilidad observada del complejo respecto a la LDL nativa. En general, valores altos de potencial zeta, independientemente de su carga, inducen fuertes repulsiones electrostáticas que resisten la floculación y precipitación, promoviendo una mayor estabilidad de las partículas.

Por último, los estudios de citotoxicidad *in vitro* revelaron que la LDL unida a las micelas de GM₁ modifica la captación celular de la Doxo así como del Ptx, aumentando la muerte de células tumorales. Este efecto fue observado incluso a tiempos de incubación prolongados con concentraciones de Doxo más bajas, lo que permitiría reducir la dosis del fármaco y minimizar el daño a los tejidos sanos. Además, se evidenció la participación de un mecanismo de transporte activo dependiente de energía, involucrado en la captación del complejo GM₁-LDL/Doxo, el cual es complementario al del complejo GM₁/Doxo, sugerido previamente [81]. Esto refuerza la idea que la LDL participa en la captación del sistema GM₁/Doxo, facilitando su absorción. Sin embargo, los resultados obtenidos no permiten establecer con claridad la intervención del RLDL en la captación del complejo.

La captación del complejo GM₁-LDL/Doxo puede ser atribuida a distintas razones que incluye la mediación del RLDL, debido a que hay evidencias documentadas principalmente en células tumorales B16 y HepG2, en donde se demuestra que la actividad del RLDL no es afectada o sólo parcialmente afectada por el nivel de LDL en el medio [181-184], pero también puede ser atribuida a la intervención de otro tipo de mecanismo de captación, independiente del RLDL, como el descrito en diferentes trabajos [179,180,185,186], el cual no es regulado por la cantidad de LDL en el medio y se ha demostrado que participa en la captación de las LDL cuando sus niveles en el medio son elevados.

Resulta importante señalar que los estudios *in vitro* se realizaron, en general, con tiempos de incubación relativamente cortos, debido a que las micelas de GM₁ se fusionan rápidamente con las células, por lo cual, cualquier cambio o

diferencia en el efecto buscado se produce en ese tiempo. No obstante, una potencial ventaja del complejo GM₁-LDL *in vivo*, es que la LDL tiene una prolongada vida media en circulación (2-3 días) y una lenta eliminación por el sistema SRE, lo que permitiría mejorar la biodistribución del complejo GM₁/fármaco y lograr mayor tiempo de permanencia para alcanzar el objetivo. Además, se ha demostrado en seres vivos que se puede reducir de forma eficiente y selectiva la expresión de los receptores de LDL en el hígado, el bazo y las glándulas suprarrenales mediante suplementos dietéticos como los ácidos biliares, o drogas como los corticosteroides, favoreciendo la captación en aquellas células que sobreexpresan los receptores [153,163].

6.6 Conclusión

Los resultados presentados en este capítulo permiten concluir que:

- Las micelas de GM₁ son capaces de interactuar con las lipoproteínas LDL y HDL, formando complejos binarios GM₁-LDL y GM₁-HDL, respectivamente, estables, de manera simple y eficiente.
- Las interacciones entre las micelas y las fracciones de lipoproteínas son de naturaleza hidrofóbicas y electrostáticas y dependen de condiciones como la temperatura, pH y la fuerza iónica.
- Los complejos GM₁-LDL son capaces de cargar Ptx y Doxo, originando complejos ternarios GM₁-LDL/Ptx o GM₁-LDL/Doxo, sin embargo, se debe respetar un orden específico de preparación para obtener complejos estables, con capacidad similar a las micelas de GM₁. Los complejos GM₁-HDL demostraron tener baja capacidad para cargar los fármacos y escasa estabilidad en medio acuoso.
- La presencia de LDL en el complejo GM₁-LDL/fármaco modifica de captación de los fármacos (Doxo, Ptx) en células tumorales Hep-2 y HeLa, aumentando la muerte celular.
- Hay evidencias de la participación de un sistema de transporte activo vinculado a la LDL, en la captación de los fármacos por las células tumorales. Sin embargo, no fue posible establecer con claridad el rol del RLDL.

Considerando los resultados obtenidos, sumado que la LDL podría mejorar el tiempo de permanencia en circulación *in vivo* del complejo GM₁/fármaco, el uso

de lipoproteínas como ligando para direccionar selectivamente micelas de GM₁ cargadas de fármacos, administrados por vía intravenosa, resulta prometedor.

7. CAPÍTULO 4

Incorporación de Ácido Fólico a la superficie de micelas de GM₁

7.1 Resumen

La unión del ácido fólico (AF) a la superficie de nanotransportadores terapéuticos es una estrategia de direccionamiento activo ampliamente estudiada contra el cáncer, debido a que numerosas células tumorales expresan niveles relativamente altos de receptores de folatos (RF), su blanco específico. En este capítulo se presentan resultados que demuestran la posibilidad de acoplar esta molécula, el AF, a las micelas de GM₁ aplicando diferentes estrategias.

La incorporación mediante interacciones no covalentes, reguladas principalmente por el pH, permite incorporar el AF en la estructura micelar, sin embargo, los complejos formados demuestran baja estabilidad y el AF es fácilmente separado por diálisis.

La incorporación, mediante la conjugación directa del AF a la superficie de las micelas demuestra una unión más estable, dando como resultado micelas de GM₁ conj-AF de tamaño y morfología similar a las micelas de GM₁, manteniendo una distribución de población homogénea. Estas micelas, modificadas de forma covalente, mantienen la capacidad de incorporar fármacos antitumorales como Ptx y Doxo, siempre y cuando la carga de los fármacos en las micelas se realice antes de la conjugación del AF, debido a que el AF superficial impide la posterior entrada. Por otra parte, se muestra que la conjugación covalente no afecta la estabilidad de los complejos GM₁conj-AF/fármaco en solución, pero resulta necesario evaluar si las reacciones de conjugación afecta la estructura o actividad de los fármacos cargados.

Finalmente, se presentan resultados referidos a la incorporación del AF en las micelas mediante una estrategia combinada, basada en la conjugación previa del AF a la Alb y la posterior incorporación del conjugado Alb-AF en las micelas.

Mediante análisis cromatográfico se demuestra que al AF conjugado a la Alb puede ser incorporado físicamente en la estructura micelar, a través de interacciones hidrofóbicas reguladas por condiciones tales como el pH y la temperatura. Los complejos GM₁-Alb conj-AF formados también son capaces de incorporar Ptx o Doxo, pero se debe seguir un orden adecuado durante la preparación, para cargar la mayor cantidad de fármaco posible y mantener el conjugado Alb-AF unido.

Los resultados de los ensayos *in vitro* utilizando células tumorales RF positivas revelan que las distintas micelas de GM₁ modificadas con AF producen efectos citotóxicos similares a aquellos producidos por las micelas de GM₁. En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que es posible incorporar AF en las micelas de GM₁ mediante diferentes estrategias.

7.2 Introducción

Los receptores de folato (RF) son una familia de moléculas de superficie celular ampliamente explorados como blanco terapéutico para el direccionamiento activo de fármacos a células tumorales [68,69,187,188]. Esto se debe a que: -están frecuentemente sobreexpresados en numerosas células tumorales humanas, incluyendo tumores malignos de ovario, cerebro, riñón, mama, células mieloides y pulmón, como consecuencia del incremento de sus necesidades de ácido fólico (AF) para la síntesis de ADN; -la densidad de estos receptores aumenta a medida que la etapa o el grado del cáncer progresa; -la captación mediada por los RF también facilita la entrada de macromoléculas o fármacos unidos al AF, en células cultivadas y en células de ratones vivos [189,190] y -porque son considerados como un blanco específico del tumor, ya que generalmente se hacen accesible a los fármacos intravenosos sólo después de la transformación maligna.

Las células normales absorben folatos fisiológicos a través de la membrana plasmática utilizando un transportador de folato reducido o el RF. El primero se encuentra en prácticamente todas las células y es la vía principal responsable de la absorción de los folatos fisiológicos. Este transportador no tiene afinidad por los folatos conjugados, por lo que diferentes sistemas funcionalizados con folato sólo interaccionan con los RF. Sin embargo, los RF solo se expresan selectivamente en la superficie de la membrana apical de ciertas células

epiteliales, siendo inaccesibles a moléculas de origen sanguíneo. Por lo tanto las células están protegidas de los fármacos circulantes dirigidos hacia el RF. En cambio, después de una transformación maligna de las células, la polaridad celular se pierde y el RF se hace accesible a fármacos provenientes de la circulación.

Otra ventaja de utilizar el RF como blanco terapéutico es que su ligando natural, el AF, es una molécula pequeña de bajo peso molecular (441 Da), muy estable en un intervalo amplio de temperaturas y pHs. No es tóxica, es fácil de modificar y compatible con una variedad de disolventes orgánicos y acuosos. Además, se une con alta afinidad al RF ($K_a = 0,1 \text{ nM}$), incluso después de haber sido modificada.

La interacción del AF o conjugados-AF con el RF conduce generalmente a un proceso de endocitosis que conduce en una acumulación citosólica de estas moléculas. A la fecha, numerosos agentes terapéuticos químicos y biológicos han sido conjugados al AF, la mayoría de los cuales demostraron una mejora significativa en la acumulación dentro de células RF positivas *in vitro* e *in vivo*, incrementando así la citotoxicidad de estos. Entre ellos, doxorrubicina [191], análogos de carboplatino [192], mitomicina C [193], profármacos de histonas deactylase tiolato [194], camptotecina [195], análogos de 5-FU [196]. Además, un conjugado de folato con un análogo de vinblastina (EC140) demostró tener actividad antitumoral contra tumores RF positivos en modelos de ratón [197]. Del mismo modo, una gran cantidad de estudios basados en el direccionamiento mediado por folatos de micelas poliméricas [198,199], macromoléculas [200], nanopartículas [201-203] y liposomas [204-206], demostraron una mejora en la actividad antitumoral de los fármacos cargados en los nanotransportadores. Incluso, se ha comprobado la eficacia de esta estrategia de transporte ante los fenómenos de resistencia a fármacos que desarrollan algunas células tumorales [207,208].

La funcionalización de micelas con AF, al igual que con otros nanotransportadores terapéuticos, puede ofrecer ventajas sobre la conjugación directa del fármaco al ligando. Con las micelas se podría mejorar la biodistribución del fármaco, por el efecto EPR y además, internalizar mayores cantidades de fármaco por receptor de folato, permitiendo tratamientos con dosis menores.

Sobre la base de los antecedentes mencionados, el objetivo de este capítulo

fue funcionalizar las micelas de GM₁ con AF, para ser direccionadas a células tumorales que sobreexpresan el RF. Se evaluaron diferentes estrategias para incorporar el AF en las micelas, las cuales incluyen una incorporación física, similar a la utilizada para la incorporación de los fármacos; una estrategia química, mediante la conjugación directa del AF a la superficie micelar y una estrategia indirecta o combinada, teniendo en cuenta la capacidad de las micelas de incorporar Alb en su estructura. Se realizó la caracterización de los sistemas obtenidos, incluyendo su tamaño, morfología, la estabilidad y se determinó la eficiencia de carga de los fármacos. Por último, se evaluó su captación celular y citotoxicidad *in vitro* mediante el ensayo de cristal violeta, usando líneas celulares RF positivas y negativas.

7.3 Materiales y métodos

7.3.1 Materiales

7.3.1.1 Reactivos

- Las soluciones de GM₁, Ptx y Doxo se prepararon como se mencionó previamente en el capítulo 1.
- El Ácido Fólico (CAS N°: 59-30-3) fue adquirido en Sigma Argentina. Las soluciones madres se prepararon disolviendo la vitamina sólida en DMSO a una concentración de 20 mg.ml⁻¹.
- La 1-[3-dimetil amino propil]-3-metiodida etilcarbodiimida fue comprado de Sigma-Aldrich.
- Las columnas de Sephadex G-200 fueron compradas en GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).
- La Albúmina sérica humana (Alb) al 20% fue proporcionada por el Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba (Córdoba, Argentina).
- Todos los demás reactivos de grado analítico se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania) y se usaron como se recibieron.

7.3.1.2 Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares B16 (células de melanoma de ratón altamente metastásicas), RF (+), crecidas en DMEM-F12; Hep-2 (células humanas de epiteloma laríngeo) RF (-) y HeLa (células humanas de epiteloma de cuello de útero) RF (-), crecidas en MEM. Para los ensayos se utilizó medio RPMI 1640, deficiente en folatos (Código de catálogo: 27016021) de Thermo Fisher Scientific Inc.

7.3.2 Métodos

7.3.2.1 Incorporación directa del AF en las micelas de GM₁

Se incubaron micelas de GM₁ a una concentración de 20mg.ml⁻¹ con cantidades crecientes de AF disuelto en DMSO hasta alcanzar relaciones molares GM₁/AF de 10/1 a 1/1, bajo agitación constante durante 30 min a 20°C. Después de la incubación, las mezclas fueron dializadas contra buffer PBS pH 7,4 (100mM) por 24 h a la misma temperatura, para eliminar el solvente y el AF no incorporado.

Para evaluar la influencia del pH en la incorporación del AF en las micelas, cantidades crecientes de AF disuelto en DMSO fue adicionado sobre las micelas [20 mg.ml⁻¹] preparadas a pH 4,77; 6,1; 7,40 y 8,77 usando buffers de acetato de sodio, fosfato de sodio y Tris, respectivamente, de concentración 100 mM. Luego, fueron dializadas usando el mismo protocolo.

La eficiencia de la incorporación se determinó directamente por espectrofotometría UV-visible midiendo la absorbancia a 363 nm, en relación a la obtenida de una solución estándar de AF, diluida en los mismos buffers.

7.3.2.2 Conjugación del AF a las micelas de GM₁

Los grupos carboxílicos (COOH) expuestos en la superficie de las micelas de GM₁ fueron conjugados con el AF, utilizando un procedimiento similar al descrito en el capítulo 1. Se incubó una solución de 20 mg.ml⁻¹ de GM₁ en buffer MES pH 4,5 con un exceso de 5 a 10 veces de 1-[3-dimetil aminopropil]-3-etilcarbodiimida metiodida (EDC-metiodida) durante 60 minutos a 20°C. La

carbodiimida reacciona con los grupos carboxílicos para formar un intermediario altamente reactivo (O-acylisourea) que posteriormente interacciona con el grupo amina, proveniente del AF, para formar una unión amida estable.

La cantidad de AF adicionado equivale a un exceso de 5 a 10 veces molar respecto al GM₁. Después de 2 horas de incubación a 25°C, la mezcla fue dializada contra buffer PBS pH 7,4 (100mM) por 48h a la misma temperatura para separar el AF libre de las micelas conjugadas GM₁-AF.

La cantidad de AF conjugado se determinó por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 363 nm, en un espectrofotómetro (UV-Visible, Shimatzu®) a partir de una curva de calibración obtenida con un estándar de AF, leído a la misma longitud de onda, que corresponde a la máxima absorción.

7.3.2.3 Conjugación del AF a la Albúmina

El AF fue conjugado a través de sus grupos carboxílicos con los grupos amino de la Alb en presencia de EDC-metiodida, de acuerdo al método de Leamon and Low [189]. Para ello, se disolvió 20 mg de AF en 1ml de DMSO y se lo incubó con un exceso molar de 5 veces de EDC-metiodida durante 30 min a 20°C en la oscuridad. Luego, una alícuota del AF "activado" fue adicionada a una solución de Alb (20 mg.ml⁻¹) en buffer pH 8, hasta obtener relaciones molares Alb/AF de 1/5 a 1/20. Después de incubar durante 4 horas a 20°C en la oscuridad, el material sin reaccionar fue separado mediante una diálisis contra buffer PBS pH 7,4 (100mM), por 48h a 20°C.

El AF conjugado se cuantificó por espectrofotometría UV-visible, midiendo la absorbancia a 363 nm de las mezclas dializadas respecto de un estándar de AF en DMSO, diluido en buffer PBS 100mM (pH 7,4).

La eficiencia de la conjugación se calculó usando la siguiente ecuación:

$$EC (\%) = \frac{mg \text{ AF conjugado}}{mg \text{ AF inicial}} \times 100$$

La concentración de la proteína se determinó usando un ensayo de Lowry (30) o por absorbancia directa a 280 nm.

7.3.2.4 Preparación de micelas de GM₁ con Albúmina conj-AF.

La incorporación de la Alb conj-AF en las micelas de GM₁ se realizó de acuerdo al procedimiento utilizado para incorporar Alb, descrito en trabajos previos de nuestro grupo [80,106].

Brevemente, soluciones de GM₁, con una concentración de 20 mg.mL⁻¹, fueron preparadas a pH 4,5 en buffer Acético/Acetato 100 mM y calentadas a 55°C durante 60min. Luego, fueron estabilizadas a 20°C antes de ser incubadas con el conjugado. Posteriormente, se adicionó una alícuota del conjugado Alb conj-AF, de 10 mg.mL⁻¹, hasta alcanzar relaciones GM₁/Alb de 1/10 a 1/1 (p/p) y se mantuvieron por 24 h a 20°C.

La interacción GM₁-Alb conj-AF fue estudiada por análisis cromatográficos y los resultados comparados con la incorporación de Alb humana, en las mismas condiciones.

7.3.2.5 Caracterización de las micelas de GM₁ modificadas con AF.

7.3.2.5.1 Tamaño y distribución de partículas

El diámetro medio y el IP de las micelas de GM₁ modificadas con AF se evaluaron mediante la técnica de dispersión de luz dinámica, usando el analizador de tamaño Delsa[™] Nano Submicron (Beckman Coulter Instruments). Las muestras fueron diluidas en buffer PBS pH 7,4 y filtradas antes de la medición. Los datos se analizaron con el software Delsa Nano Beckman Coulter (versión 2.2) proporcionado por el fabricante con el método de análisis CONTIN. Todas las mediciones se realizaron por triplicado, para cada uno de cinco lotes independientes de micelas.

7.3.2.5.2 Determinación de la carga neta superficial de las micelas modificadas

El potencial zeta de las micelas de GM₁ modificadas fue determinado usando el analizador Delsa[™] Nano zeta potential analyzer (Beckman Coulter Instruments,) a temperatura ambiente. Las muestras se prepararon en buffer PBS pH 7,4 (145mM de NaCl) y filtradas antes de la medición. El potencial zeta

se determinó por triplicado de 5 lotes de micelas y los resultados fueron obtenidos automáticamente por el analizador.

7.3.2.5.3 Análisis cromatográficos

Los complejos GM₁-Alb conj-AF fueron separados y cuantificados por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Las muestras y los controles se analizaron en un sistema Akta Explorer 100 (GE Healthcare) equipado con una columna Superdex G-200, previamente equilibrada con buffer fosfato pH 7,4 (50mM) y NaCl 150 mM, a una velocidad de 0,4 ml.min⁻¹.

El perfil de elución fue monitoreado mediante un detector UV-visible a 280 nm y 363nm, y el contenido de Alb unida a las micelas se cuantificó usando un ensayo de Lowry [142].

7.3.2.6 Incorporación de Ptx o Doxo en las micelas de GM₁ modificadas con AF

Para evaluar la capacidad de las micelas GM₁-AF para cargar fármacos, se incubó 10 mg.ml⁻¹ de las diferentes micelas GM₁-AF obtenidas, según la estrategia de preparación, con cantidades crecientes de Ptx o Doxo, hasta alcanzar relaciones molares GM₁/fármaco desde 50/1 a 1/1.

La carga de los fármacos se realizó a 20°C en agitación constante durante 30 min antes de refrigerar las muestras a 4°C durante 24 h. Pasado ese tiempo, fueron centrifugadas a 14000 rpm y los sobrenadantes dializados contra buffer PBS pH 7,4 por 24 h o eluidas a través de una columna de exclusión por tamaño, para separar el fármaco libre del incorporado en las micelas. La cuantificación de los fármacos incorporados se realizó según se describió en el capítulo 1.

7.3.2.7 Citotoxicidad *in vitro* de las micelas GM₁-AF/fármaco sobre líneas celulares tumorales

Se utilizaron células B16 RF (+), HeLa y Hep-2 RF (-) crecidas en placas de 96 pocillos crecidas a un 90 % de confluencia. Los ensayos fueron llevados a cabo en RPMI 1640 deficiente en folatos sin suero fetal bovino. Las monocapas se incubaron con GM₁-AF/Doxo y micelas GM₁/Doxo a concentraciones finales de

10, 25, 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ Doxo en el medio sin folatos durante 1, 2 y 3 h. Pasado ese tiempo, se reemplazó las muestras por medio sin suero y se incubaron nuevamente durante 24h. Luego de la incubación, se evaluó la viabilidad celular usando el ensayo de cristal violeta y se comparó los resultados entre las muestras. El ensayo, la cuantificación de la viabilidad y el análisis estadístico se realizaron como se mencionó en los capítulos precedentes 1 y 2.

Los ensayos con Ptx ($1\text{-}20\text{ng}.\text{ml}^{-1}$) se realizaron de forma similar a los de Doxo, excepto que, las monocapas celulares fueron incubaron con Ptx, GM_1/Ptx o $\text{GM}_1\text{-AF}/\text{Ptx}$ durante 24hs, antes de reemplazar las muestras por medio solo.

7.4 Resultados

7.4.1 Preparación de micelas de GM_1 modificadas con AF

El primer objetivo de este capítulo fue obtener micelas de GM_1 con AF en su superficie; que demuestren una unión estable y conserven las propiedades micelares. Con este fin, se evaluaron diferentes métodos para acoplar el AF a las micelas, que incluyen la adsorción física o unión covalente. También se evaluó la incorporación mediante una estrategia combinada a partir de la conjugación previa del AF a la proteína Alb.

Considerando que el AF es poco soluble en agua ($0,01\text{ mg}.\text{ml}^{-1}$), insoluble en soluciones acuosas por debajo de pH 5 (fig. 58A) y soluble en bicarbonato sódico o hidróxido de sodio 1M ($50\text{ mg}.\text{ml}^{-1}$), se evaluó la incorporación directa de cantidades crecientes de AF, disuelto en DMSO, en las micelas de GM_1 a diferentes pH. Puede verse en la fig. 58B, que a pH 4,5, en el cual el AF es completamente insoluble (58A), la presencia de micelas fue capaz de mantener una fracción soluble. Del mismo modo, en los otros pH evaluados, las micelas incrementaron la solubilidad del AF, lo que demuestra que efectivamente hay interacción entre ambos compuestos.

Por otra parte, y pensando en una condición similar a la fisiológica (fig. 58C), se evaluó la incorporación del AF a pH 7,4, para determinar la cantidad máxima de vitamina incorporada en las micelas de GM_1 . En la fig. 58C se observa que las micelas son capaces de solubilizar hasta $5,7\text{ mg}.\text{ml}^{-1}$ de AF, lo que representa una relación molar GM_1/AF 1/1.

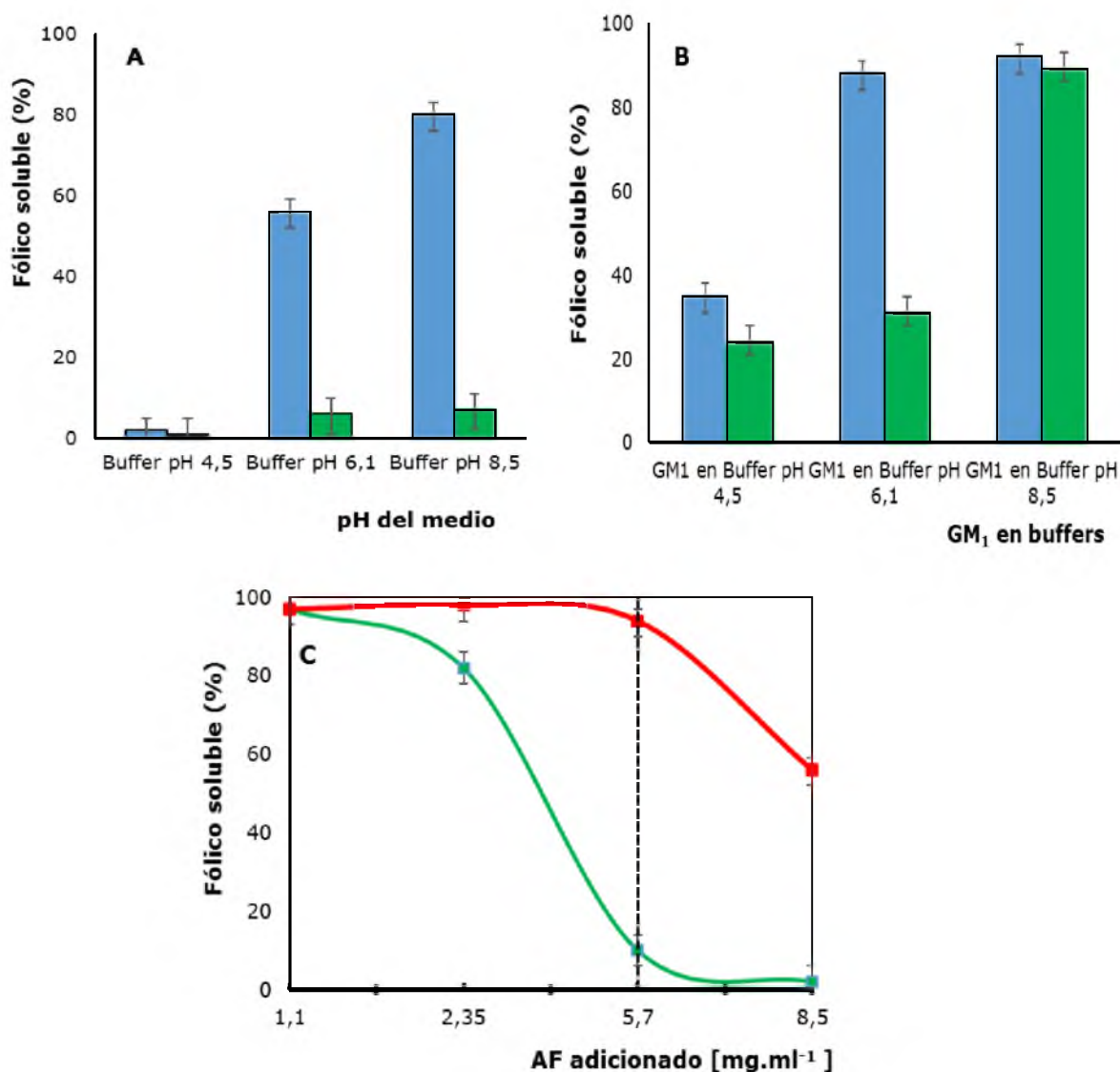


Figura 58: Incorporación directa del AF en micelas de GM₁. **A:** Solubilidad del AF disuelto en DMSO, en buffers de distintos pH. Concentración de AF: 2,35 mg.ml⁻¹ (■) y 5,7 mg.ml⁻¹ (■). **B:** Solubilidad del AF disuelto en DMSO, incubado con micelas de GM₁ en buffers de distintos pH. Concentración de GM₁: 20mg.ml⁻¹, Concentración de AF: 2,35 mg.ml⁻¹ (■) y 5,7 mg.ml⁻¹ (■). **C:** AF disuelto en DMSO, incubado en: solución buffer PBS pH 7,4 100mM (■) y micelas de GM₁: [20mg.ml⁻¹] en buffer PBS pH 7,4 100mM (■). Las barras de error indica la DS de la media (n=5)

Sin embargo, se observó que después de dializar las mezclas contra buffer pH 7,4 durante 48hs, más del 90% del AF fue eliminado, independientemente del pH utilizado en la preparación. Esto revela que la interacción entre las micelas y el AF es débil y no permite obtener complejos GM₁conj-AF estables en solución.

A continuación, el AF fue conjugado a las micelas de GM₁ de forma covalente a través de los grupos carboxílicos expuestos en la superficie micelar, en presencia de EDC. Después de una diálisis exhaustiva para eliminar los reactivos

excedentes, se obtuvieron soluciones de color amarillo, sin presencia visible de agregados ni precipitados. Mediante espectrofotometría se determinó que, aproximadamente 1,2 μ moles de AF se conjugaron a los grupos superficiales de 12,9 μ moles de micelas ($20\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), equivalente a una relación molar 10/1 GM_1/AF . La eficiencia de conjugación no mejoró con concentraciones mayores de AF o reactivo de conjugación, lo que sugiere que las micelas alcanzaron su capacidad máxima de conjugación (tabla X).

Tabla X: Cuantificación del AF unido a micelas de GM_1 [$20\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$] pre y pos-diálisis.

Muestra	Pre-diálisis (mg/ml)	Pos-diálisis (mg/ml)	Fólico remanente (%)
Fólico control	1,10	0,036	3,27
	1,35	0,045	3,33
	1,60	0,068	4,25
GM_1-Fólico sin conjugar	1,05	0,072	6,86
	1,29	0,083	6,43
	1,55	0,123	7,93
GM_1-Fólico conjugado	1,13	0,489	43,3
	1,37	0,548	40,0
	1,62	0,456	28,1

Por último, y considerando que la Alb puede asociarse a las micelas de GM_1 , como se demostró en trabajos previos [80,106], se evaluó la incorporación del AF en las micelas a través de la Alb.

Después de conjugarse el AF a la proteína, en presencia de EDC, se cuantificó el AF conjugado y la Alb para determinar la eficiencia de la conjugación. Los resultados de la Tabla XI muestran que la mayor eficiencia se consigue a partir de la relación Alb/AF 1/5 (mol/mol), con la cual se obtiene un conjugado Alb-AF de relación molar 1/10.

Tabla XI: Eficiencia de la conjugación del AF a la Albúmina sérica humana por EDC, a diferentes relaciones molares Alb/AF.

Relación molar Albúmina/ Fólico	Albúmina inicial (teórica) (mg/ml)	Albúmina conjugada (mg/ml)	Albúmina conjugada (%)	Fólico inicial (teórico) (mg/ml)	Fólico conjugado (mg/ml)	Fólico conjugado (%)
1:5	40	12,4	31	1,33	0,84	63
1:10	40	13,5	33,75	2,65	1,18	44,5
1:20	40	12,3	30,75	5,3	1,25	23,6

Seguidamente, el conjugado Alb-AF (relación 1/10 mol/mol) se incorporó en las micelas de GM₁, de acuerdo al procedimiento utilizado para incorporar Alb, descrito en trabajos previos [80,106]. Mediante ese procedimiento, la Alb se une a las micelas a través de interacciones hidrofóbicas, debido a que la proteína se desnaturaliza parcialmente y expone parte de sus residuos hidrofóbicos, favoreciendo la interacción.

El análisis cromatográfico de la mezcla GM₁-Alb conj-AF (fig. 59A), muestra que el conjugado Alb-AF eluyó en el V₀ de la columna (fracción no retenida), la misma fracción donde eluyen las micelas de GM₁ por su tamaño. Esto demuestra evidentemente, que la Alb conj-AF, al igual que la Alb nativa, está unida a las micelas de GM₁. La diferencia observada a 280nm, entre GM₁-Alb y GM₁-Alb conj-AF en el V₀ de la columna, corresponde a la absorbancia del AF. Por otra parte, el perfil cromatográfico monitoreado a 363 nm (Fig. 59B); longitud de onda de máxima absorción del AF, confirma este resultado.

En la condición descripta, la Alb conj-AF eluyó unida a las micelas de GM₁ hasta alcanzar la relación GM₁/Alb 2/1 (p/p), revelando que las micelas alcanzaron la saturación.

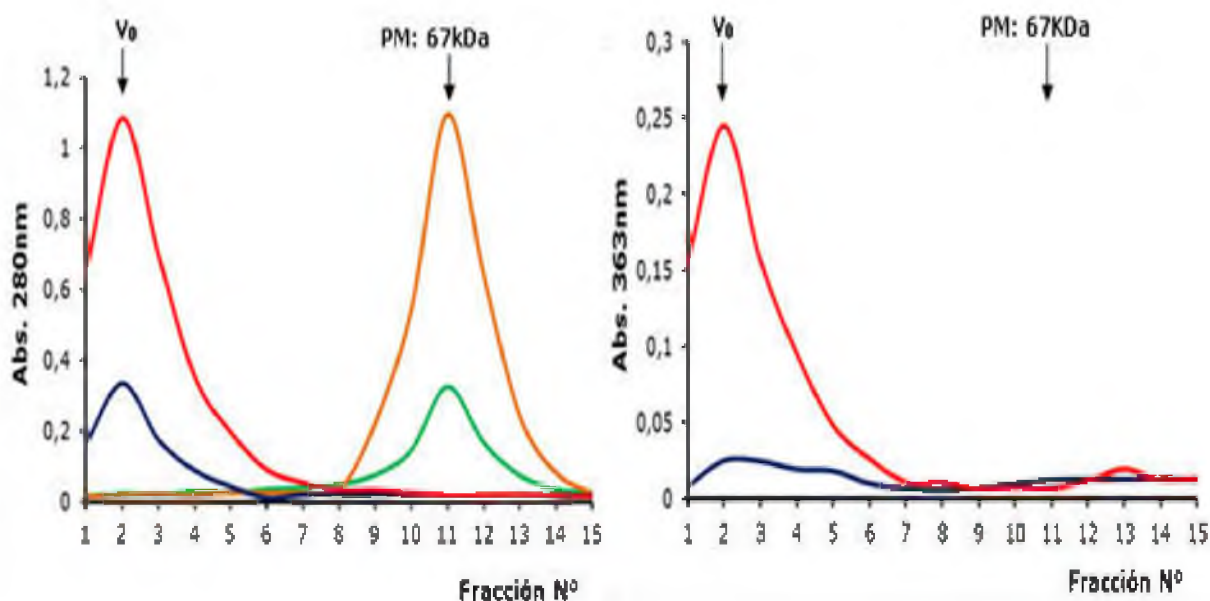


Figura 59: Perfiles de elución obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de micelas de GM_1 incubadas con Alb y Alb conj-AF. **A.** Cromatografía por Superdex G-200® de la Alb (—), Alb conj-AF (—), micelas de GM_1 -Alb (—) y micelas de GM_1 -Alb conj-AF (—), leídos a 280nm. **B.** Cromatografía por Superdex G-200® de micelas de GM_1 -Alb (—) y micelas de GM_1 -Alb conj-AF (—), leídos a 363nm. Condición de preparación: micelas de GM_1 calentadas a 55°C, estabilizada a Temperatura Ambiente antes de incubarse con Alb a pH 3. Micelas de GM_1 20 mg.mL⁻¹ con Alb 5 mg.mL⁻¹.

7.4.2 Incorporación de fármacos en las micelas de GM_1 modificadas con AF.

En el punto anterior se describió que las micelas de GM_1 pueden ser modificadas con AF de dos formas diferentes. A continuación, evaluamos si estas modificaciones afectan su capacidad para cargar fármacos.

Primero, se analizó la incorporación de Ptx y Doxo en las micelas de GM_1 conj-AF de forma directa. Los ensayos revelaron que ninguno de los fármacos se incorpora de manera eficiente en la estructura micelar, después de la conjugación del AF. Más del 90% del Ptx adicionado (relación GM_1 /Ptx 10:1mol/mol) precipita después de incubarlo con las micelas modificadas; incluso cuando la cantidad adicionada fue baja (relación GM_1 /Ptx 25:1mol/mol), su estabilidad en solución fue de unas pocas horas. Respecto a la Doxo, se observó que después de incubarla con GM_1 conj-AF (relación GM_1 /Doxo 10/1mol/mol), una fracción del fármaco precipitó junto con GM_1 y otra parte fue separada fácilmente por diálisis, indicando que estaba soluble pero fuera de la micela.

Ambos resultados sugieren que la conjugación directa del AF a las micelas de GM₁ induce un cambio en la superficie micelar, que imposibilita la entrada posterior de los fármacos. Concuerdan además, con resultados previos, en los cuales se demostró que modificaciones realizadas en el grupo polar del gangliósido, como la lactonización de su ácido siálico, alteran la capacidad para solubilizar taxanos [80].

Cuando la incorporación del Ptx o la Doxo se efectuó antes de la conjugación con el AF, se obtuvieron complejos GM₁conj-AF/Ptx y GM₁conj-AF/Doxo estables, con una eficiencia de carga equivalente a las micelas de GM₁ puras [80,81]. Sin embargo, en esta condición de preparación se podría estar afectando la actividad del fármaco cargado, debido a las reacciones de conjugación. Principalmente la Doxo, como consecuencia de su ubicación más externa en la micela.

Del mismo modo, se evaluó la incorporación del Ptx y la Doxo en las micelas de GM₁ modificadas con Alb conj-AF. Estos estudios se realizaron a partir de micelas saturadas con Alb conj-AF (relación GM₁/Alb conj-AF 2/1 p/p), puesto que presentan la mayor cantidad de AF incorporado con esta estrategia.

Los resultados de la Tabla XII indican que la incorporación del Ptx en los complejos GM₁-Alb conj-AF ya formados se encuentra bastante impedida; únicamente cuando la cantidad de Ptx adicionada fue baja, relaciones molares GM₁/Ptx entre 30/1 y 50/1, se mantuvo soluble, es decir unido al complejo. No obstante, cuando el fármaco se cargó en las micelas previo a la incubación con Alb conj-AF, se obtuvieron complejos ternarios GM₁/Ptx/Alb conj-AF estables, los cuales se mantuvieron sin disociarse por más de 15 días, almacenados a 4°C y en oscuridad. En esta condición, la cantidad de Alb conj-AF unida no se modificó.

Tabla XII. Incorporación de Ptx en micelas de GM₁ previamente incubadas con Alb conj-AF y en micelas de GM₁ antes de ser incubadas con Alb conj-AF, a distintas relaciones molares GM₁/Ptx. Relación GM₁/Alb conj-AF 2/1 p/p.

Relación Molar GM ₁ /Ptx (mol/mol)	Ptx soluble (%)	
	GM ₁ -Alb conj-AF/Ptx	GM ₁ /Ptx /Alb conj-AF
5/1	11	96
10/1	23	97
15/1	56	99
30/1	97	96
50/1	98	97

Nuevamente, estos resultados reflejan la importancia de seguir un orden específico en la preparación, para obtener complejos ternarios GM₁/Ptx/proteína, estables en solución. El orden adecuado es incorporando primero el Ptx y luego la proteína, debido probablemente a que éstas ocupan dominios más superficiales que el fármaco en la micela, impidiendo su posterior entrada.

Respecto a la Doxo, se observó que la presencia previa de Alb conj-AF en las micelas también afecta fuertemente su incorporación. En las micelas saturadas con Alb conj-AF (relación GM₁/Alb conj-AF 2/1 p/p), la cantidad máxima de Doxo incorporada se alcanzó en la relación GM₁/Doxo 20:1, bastante menor respecto a la carga de las micelas de GM₁ puras. Por otra parte, cuando la Doxo se incorporó en las micelas (GM₁/Doxo 5/1 mol/mol) previo a la incubación con Alb conj-AF, afectó la unión de la Alb conj-AF. En esta condición, la cantidad máxima de Alb conjugada que se unió a GM₁/Doxo se redujo un 65%, alcanzando la saturación en la relación GM₁/Alb conj-AF 6/1 p/p. Esto sugiere que ambas moléculas comparten dominios de unión dentro de la estructura micelar.

Nuevamente, estos resultados proporcionan evidencias que refuerzan la idea que la carga y la modificación de las micelas de GM₁ requieren un orden o una secuencia específica de preparación para obtener sistemas óptimos.

7.4.3 Caracterización de las micelas de GM₁ modificadas con AF

Las micelas de GM₁ modificadas con AF que demostraron ser estables y conservar sus propiedades micelares se les determinó su diámetro medio, el IP y morfología. Los resultados de su caracterización en comparación con las micelas de GM₁ se enumeran en la Tabla XIII. Puede verse que la conjugación directa del AF a la superficie de las micelas no modificó su tamaño, conservando una distribución de población relativamente homogénea. En cambio, cuando el AF fue incorporado a través de la albúmina aumentó significativamente el tamaño micelar, de 13,6 a 23,4 nm, lo que refleja la presencia de la proteína en la estructura micelar. En estas micelas, la incorporación previa de Ptx o posterior de Doxo, no afectó sustancialmente el tamaño, sin embargo, los complejos GM₁-Alb conj-AF/Doxo muestran un IP relativamente más alto, lo que sugiere que Doxo posee una mayor influencia en la reorganización de la estructura micelar, debido probablemente a su localización más externa.

Tabla XIII: Características físico-químicas de micelas de GM₁ modificadas con AF. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar de la media ($n = 5$).

Muestras	Parámetros	
	Diámetro medio (nm)	Índice de Polidispersidad (IP)
Albúmina	7,6 \pm 1	0,11 \pm 0,06
GM₁	13,6 \pm 3	0,12 \pm 0,07
GM₁ conj-AF	12,8 \pm 4	0,12 \pm 0,08
GM₁-Alb conj-AF	23,4 \pm 3	0,18 \pm 0,07
GM₁/Ptx/Alb conj-AF	21,9 \pm 2	0,13 \pm 0,07
GM₁-Alb conj-AF/Doxo	24,6 \pm 3	0,24 \pm 0,09

La fig. 60 muestra algunas de las micrografías obtenidas mediante TEM de alta resolución. Puede verse que las micelas de GM₁ (60A) mantienen siempre su forma esférica, independiente del método de modificación con AF (60B,C). Además, se observa que la modificación de las micelas a través de la asociación con la Alb conj-AF incrementa significativamente su tamaño (60C), generando una distribución de población más dispersa. Observación que coincide con los resultados obtenidos por DLS.

Por otra parte, las imágenes 60D y 60E muestran que la carga de Ptx o Doxo, respectivamente, no modifica sustancialmente el tamaño de las micelas de GM₁-Alb conj-AF, confirmando que la Alb es la principal responsable del incremento del tamaño de las micelas de GM₁.

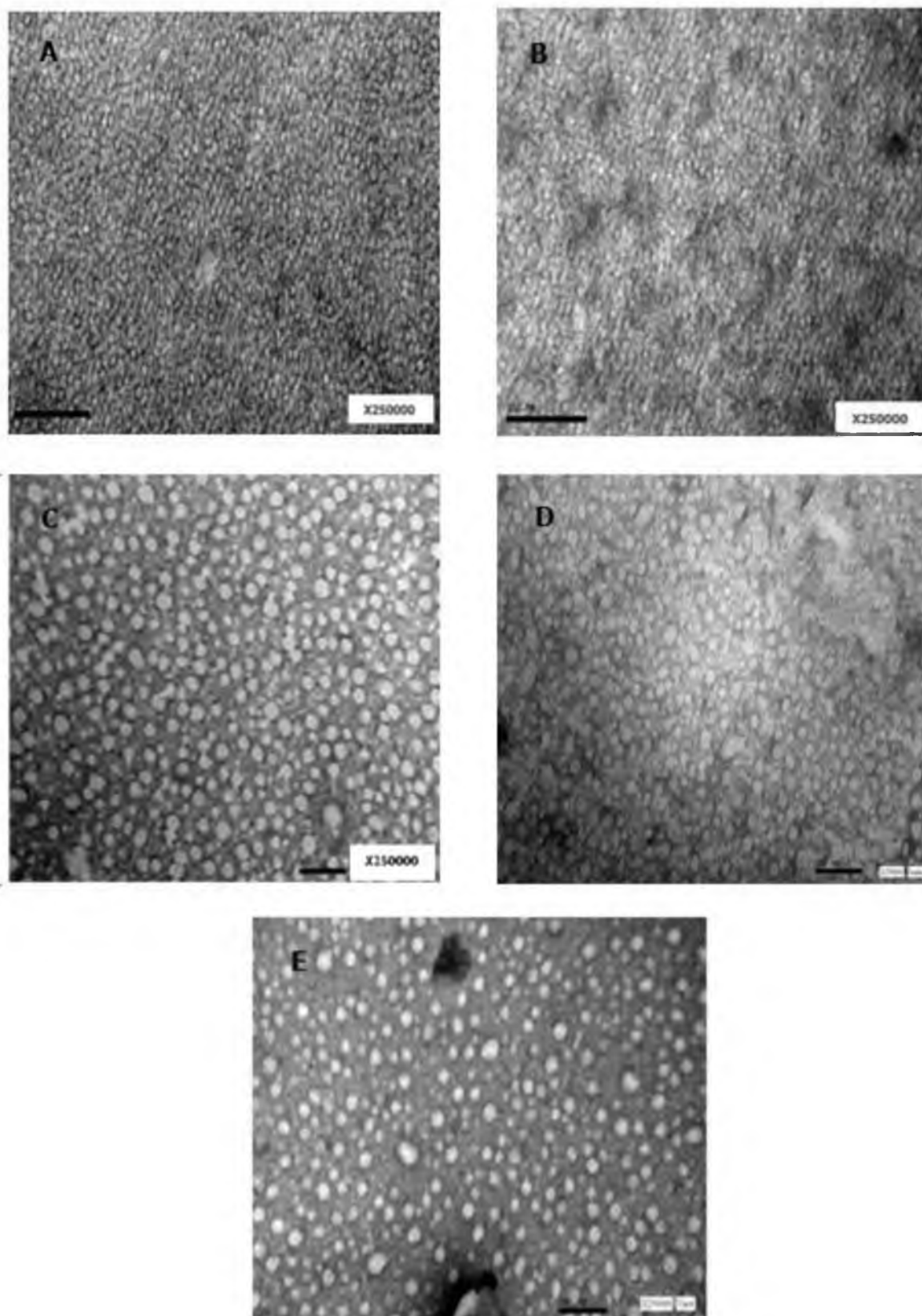


Figura 60: Micrografías electrónicas de: micelas de GM_1 (A), micelas de GM_1 conj-AF (B), micelas de GM_1 -Alb conj-AF (C), micelas de GM_1 /Ptx-Alb conj-AF (D) y micelas de GM_1 -Alb conj-AF/Doxo (E). X250000. Tamaño barra: 100 nm.

7.4.4 Efecto citotóxico *in vitro* de las micelas de GM₁ modificadas con AF.

Finalmente, se analizó el efecto citotóxico *in vitro* de la Doxo y el Ptx contenido en las micelas modificadas con fólido mediante el ensayo cristal violeta sobre células B16 RF (+) y se lo comparó con las micelas de GM₁/Doxo y GM₁/Ptx, respectivamente.

Los resultados no mostraron diferencias significativas de actividad citotóxica entre las micelas modificadas con AF y las de GM₁ (fig. 61). Resultados similares se obtuvieron cuando se evaluó el efecto del Ptx.

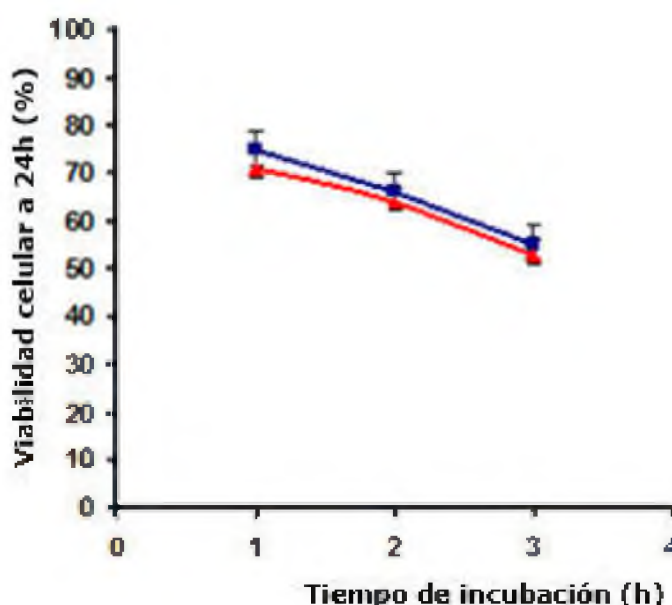


Figura 61: Efecto citotóxico *in vitro* de GM₁/Doxo y GM₁-Alb conj-AF/Doxo después de 1, 2, 3 h de incubación sobre células B16 RF (+). GM₁/Doxo con $[Doxo]_{efec}$ de: $10\mu g.mL^{-1}$ (—) y GM₁-Alb conj-AF/Doxo con $[Doxo]_{efec}$ de: $10\mu g.mL^{-1}$ (—). Las barras de error indica la DS de la media ($n=5$)

7.5 Discusión

Es bien conocido que muchos tumores sobreexpresan el receptor de ácido fólico, por lo cual se lo considera una opción adecuada como blanco terapéutico y al AF un ligando específico para dirigir fármacos o sistemas transportadores de fármacos hacia las células tumorales.

Existe abundante bibliografía acerca de la unión del AF a nanotransportadores para dirigir selectivamente fármacos antitumorales a células cancerosas tanto *in*

vitro como *in vivo*. En este capítulo, se propuso acoplar el AF a la superficie de micelas de GM₁, con el objetivo de mejorar la selectividad de este nanotransportador hacia líneas celulares tumorales que expresan el RF.

Los resultados obtenidos demuestran que es posible incorporar AF en la estructura micelar, de dos formas diferentes. Una de ellas, requiere carbodiimida soluble en agua para conjugar los ácidos carboxílicos disponibles de la micela con el AF. En este caso, la conjugación directa del AF a la superficie no modifica el tamaño ni la forma de las micelas de GM₁, conservando una distribución de población relativamente homogénea. Sin embargo, la presencia del AF en la superficie impide la posterior incorporación de Ptx o Doxo en la estructura micelar. Para obtener complejos GM₁conj-AF/fármaco eficientes y estables en solución, se debe cargar el fármaco en las micelas, previo a la conjugación del AF. Cumpliendo este orden de preparación, es importante tener en cuenta que, se podría afectar la actividad del fármaco cargado, debido a las reacciones de conjugación; principalmente, cuando el fármaco es la Doxo por su ubicación más externa en la micela. No obstante, si consideramos que numerosos fármacos oncológicos han sido conjugados a diferentes moléculas como polímeros, anticuerpos, entre otros [209-212], sin que se altere su estructura y actividad biológica, cuando la conjugación se realiza en condiciones de reacción suaves como la utilizada en nuestro caso, la probabilidad que se afecte la actividad del fármaco cargado en la micela es baja.

La segunda alternativa aprovecha la capacidad de las micelas de GM₁ de interactuar espontáneamente con la Alb humana [106]. Esta estrategia comprende la conjugación previa del AF a la Alb y la posterior unión del conjugado Alb-AF a la estructura micelar. Los estudios cromatográficos de las mezclas analizadas demuestran que la interacción entre el conjugado y las micelas ocurre efectivamente [106]. Por otra parte, los resultados de DLS y microscopía electrónica muestran un incremento significativo en el tamaño de las micelas cuando se las incubó con el conjugado, de 13,6 a 23,4 nm, lo que revela la presencia de una nueva estructura.

En la condición de interacción más favorable, es decir cuando las micelas son previamente calentadas a 55°C, estabilizadas a 20°C e inmediatamente incubadas con el conjugado Alb-AF a pH 3, se consigue preparar complejos GM₁-Alb conj-AF estables hasta una relación GM₁/Alb 2/1 (p/p).

Los resultados aquí descriptos también muestran que los complejos GM₁-Alb

conj-AF son capaces de incorporar fármacos oncológicos como el Ptx o la Doxo. Como en otros casos antes descriptos, se requiere seguir un orden específico para incorporar cantidades elevadas de fármaco y mantener el conjugado unido. El Ptx debe ser incorporado en las micelas antes de la incubación con el conjugado para obtener complejos ternarios GM_1 /Ptx-Alb conjAF, con la misma eficiencia de carga de las micelas de GM_1 . La Doxo debe ser incorporada en las micelas después de la incubación con el conjugado para no afectar su unión. Los ensayos realizados a partir de micelas saturadas con Alb conjAF (relación GM_1 /Alb conjAF 2:1 p/p) mostraron que cargan hasta una relación GM_1 /Doxo de 20:1 de forma eficiente, algo menor si la comparamos a las micelas de GM_1 puras.

Por último, si bien los resultados *in vitro* no mostraron diferencias significativas de actividad citotóxica entre las micelas modificadas con AF y las de GM_1 , esto puede deberse a muchos motivos, el modelo "in vitro" es un sistema estático que dista mucho de la situación real, sumado a que el nanotransportador utilizado, las micelas de GM_1 , tienen de por sí una elevada eficiencia de entrada en las células.

7.6 Conclusión

Los resultados presentados en este capítulo demuestran nuevamente, que las micelas de GM_1 presentan una estructura muy versátil que pueden ser modificadas con AF aplicando diferentes estrategias. En síntesis, los resultados obtenidos muestran que:

- Se puede incorporar AF de modo covalente en la superficie de micelas de GM_1 , en forma estable y eficiente.
- Las micelas conjugadas con AF mantienen su capacidad de vehiculizar fármacos como Ptx y Doxo, pero su preparación requiere seguir un orden adecuado.
- Se puede incorporar AF en micelas de GM_1 , a través de la conjugación previa del AF a la Alb y la posterior unión del conjugado Alb-AF a la estructura micelar.
- Las distintas micelas modificadas con AF no modifican la captación y actividad citotóxica de los fármacos cargados sobre líneas celulares tumorales RF positivas.

8. Conclusiones

La efectividad demostrada de las micelas de GM₁ para el transporte de fármacos oncológicos de distinta naturaleza polar, como el Ptx (hidrofóbico) y la Doxo (anfipática); sumado a las características fisicoquímicas de los monómeros constituyentes, nos permitieron plantear la posibilidad de modificar la superficie micelar mediante una serie de estrategias de direccionamiento, con el fin de lograr la mejora del sistema.

El presente trabajo de tesis demuestra que las micelas de GM₁ son estructuras muy versátiles que tienen la capacidad de reorganizarse, de aumentar o disminuir su tamaño en función de la naturaleza de la modificación introducida o de la cantidad del ligando con el que interaccionan. Se demostró que el ácido siálico presente en la superficie micelar permite la conjugación de los gangliósidos a una poliamina (espermidina), modificando la carga neta superficial de la micela. Este cambio no altera la capacidad de las micelas de incorporar fármacos ni la estabilidad de las micelas/fármaco en solución, pero modifica la cinética de internalización de los fármacos al interior celular, haciendo de este sistema una alternativa interesante a considerar para la administración de fármacos. Asimismo, el ácido siálico de la superficie micelar también permite la conjugación covalente del AF a los gangliósidos; el ligando natural de los RF expresados en numerosas células tumorales. En este caso, se mostró que la modificación superficial de la micela con AF impide la posterior incorporación de los fármacos. Para obtener complejos GM₁conj-AF/fármaco eficientes, se debe cargar el fármaco antes de la conjugación del AF, sin embargo, en estos complejos resulta inevitable evaluar si las reacciones de conjugación afectan la estructura o actividad de los fármacos cargados. Además, los ensayos *in vitro* realizados con estas estructuras micelares demostraron que son igualmente capaces de liberar el fármaco encapsulado al entrar en contacto con células, sin embargo, en las condiciones experimentales seleccionadas no revelaron ser más eficientes o selectivas respecto a las micelas de GM₁, sobre células tumorales RF positivas.

Por otra parte, se ha demostrado que las micelas de GM₁ son capaces de formar complejos estables con inmunoglobulinas IgG (inmunomicelas), en donde los anticuerpos (IgG) mantienen su capacidad de reconocimiento específico y no

son desorbidos o desplazados por otras proteínas plasmáticas. Se demostró que la asociación GM₁-IgG es dominada por fuerzas hidrofóbicas ya que el aumento de la hidrofobicidad de la micela producto del calentamiento hasta los 55 °C, como así también la incubación de la proteína a pH 4,5 en donde ésta expone sus residuos hidrofóbicos al ambiente acuoso, son condiciones que favorecen notablemente la interacción. La incorporación de IgG aumenta gradualmente el tamaño de las micelas, de acuerdo con la cantidad de IgG cargada. También se demostró que estas inmunomicelas son capaces de encapsular los fármacos, pero se debe seguir un orden adecuado para obtener complejos eficientes. Si bien los ensayos *in vitro* no revelaron diferencias significativas en el efecto citotóxico de los complejos GM₁-IgG/fármaco respecto a GM₁/fármaco, el modelo constituye apenas una primera herramienta en lo que se refiere a la actividad biológica, con diferencias sustanciales en relación a un sistema *in vivo*, donde ya el hecho de que la actividad del fármaco se mantenga y el vehículo no muestre mayor toxicidad, constituyen dos eventos indispensables para cualquier sistema en evaluación. Otra opción del sistema, es la alternativa que ofrece el modelo GM₁-IgG/fármaco como un sistema dual o multifuncional, en el cual se puede combinar la acción del anticuerpo con el del fármaco transportado dentro de la micela.

Por último, se demostró que las micelas de GM₁ interaccionan con macromoléculas lipoproteicas, como las LDL, formando complejos estables. Estos complejos, formados por varias moléculas, son capaces de transportar fármacos y facilitan la internalización del Ptx o Doxo en células tumorales a través de procesos de transporte activo vinculados a las LDL. Además, son capaces de mantener sus propiedades después de ciertos procesos como centrifugación, diálisis, liofilización-solubilización, entre otros. La asociación de LDL a las micelas puede resultar muy beneficiosa porque la LDL tiene una prolongada vida media en circulación (2-3 días) y una lenta eliminación por el sistema SRE, lo que permitiría mejorar la biodistribución del complejo GM₁/fármaco y lograr mayor tiempo de permanencia para alcanzar el objetivo. Estos resultados nos permiten sugerir que el uso de lipoproteínas como ligando para direccionar selectivamente micelas de GM₁ cargadas de fármacos resulta prometedor.

El conjunto de resultados presentados en este trabajo nos permite concluir que es posible modificar la superficie de las micelas de GM₁ con moléculas de reconocimiento celular con el objetivo de diseñar micelas funcionales con

características adecuadas para cada uso particular requerido.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Instituto Nacional del Cáncer. Página web: www.cancer.gov/espanol.
- [2]. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57-70, 2000.
- [3]. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144:646-674, 2011.
- [4]. American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures, 3rd Edition, 2015.
- [5]. Stewart BW and Wild CP. World Cancer Report 2014. IARC Non-series Publication. ISBN-13 9789283204299. 2014. <http://www.iarc.fr>
- [6]. Triggie DJ. Drug development in the 21st century: medicines, man and receptors. *Med Chem Res* 13(3-4):238-248, 2004. doi:10.1007/s00044-004-0031-9
- [7]. Brekke OH and Sandlie I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* Vol. 2: 52-62, 2003. doi:10.1038/nrd984
- [8]. Nagle T, Berg C, Nassr R, Pang K. The further evolution of biotech. *Nat. Rev. Drug Discov.* Vol. 2: 75-79, 2003. doi:10.1038/nrd989
- [9]. Harada H, Kizaka-Kondoh S and Hiraoka M. Antitumor Protein Therapy; Application of the Protein Transduction Domain to the Development of a Protein Drug for Cancer Treatment. *Breast Cancer* 13:16-26, 2006. doi.org/10.2325/jbcs.13.16
- [10]. Weidle UH, Schneider B, Georges G and Brinkmann U. Genetically Engineered Fusion Proteins for Treatment of Cancer. *Cancer Genomics & Proteomics* 9: 357-372, 2012.
- [11]. Castanotto D and Stein Cy A. Antisense oligonucleotides in cancer. *Curr Opin Oncol* 26:584-589, 2014. doi:10.1097/CCO.0000000000000127
- [12]. Cavalli F. Cáncer: El gran desafío. Traducción de la edición alemana por César Alfredo Hernández Travieso. Editorial Ciencias Médicas, Cuba, 2012.
- [13]. Alexis F et al. Nanoparticle Technologies for Cancer Therapy. *Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology* 197, 2009. doi:10.1007/978-3-642-00477-3_2.
- [14]. Torchilin VP. Nanoparticulates Drug Carriers. Imperial College Press, 2006.

- [15]. NNI. What is nanotechnology? Available online: <http://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>.
- [16]. Mousa SA and Bharali DJ. Nanotechnology-Based Detection and Targeted Therapy in Cancer: Nano-Bio Paradigms and Applications. *Cancers* 3: 2888-2903, 2011. doi:10.3390/cancers3032888
- [17]. Kukowska-Latallo JF, Candido KA, Cao Z, Nigavekarand Majoros SS, Thomas TP, Balogh LP, Khan MK and Baker JR. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Res*, 65:5317-5324, 2005.
- [18]. Pastorin G, Wu W, Wieckowski S, Briand JP, Kostarelos K, Prato M and Bianco A. Double functionalization of carbon nanotubes for multimodal drug delivery. *Chem Commun* 11:1182-1184, 2006. doi: 10.1039/b516309a
- [19]. Gidwani B and Vyas A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *BioMed Research International*. Article ID 198268, 2015. doi.org/10.1155/2015/198268
- [20]. Flenniken ML, Willits DA, Harmsen AL, Liepold LO, Harmsen AG, Young MJ, and Douglas T. Melanoma and lymphocyte cell-specific targeting incorporated into heat shock protein cage architecture. *Chemistry & Biology*, 13: 161-170, 2006. doi10.1016/j.chembiol.2005.11.007
- [21]. Callaghan R, Luk F and Bebawy M. Inhibition of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein: Time for a Change of Strategy?. *Drug Metab Dispos* 42:623–631, 2014. doi.org/10.1124/dmd.113.056176
- [22]. Dong X and Mumper RJ. Nanomedicinal strategies to treat multidrug-resistant tumors: current progress. *Nanomedicine*; 5(4): 597–615, 2010. doi:10.2217/nnm.10.35.
- [23]. Hoosain FG et al. Bypassing P-Glycoprotein Drug Efflux Mechanisms: Possible Applications in Pharmacoresistant Schizophrenia Therapy. *BioMed Research International*. Article ID 484963, 2015. doi.org/10.1155/2015/484963
- [24]. Ma L, Kohli M, and Smith A. Nanoparticles for Combination Drug Therapy. *ACS Nano*. 7(11): 9518–9525, 2013. doi:10.1021/nn405674m.
- [25]. Zhang RX, Wong HL, Xue HY, Eoh JY and Wu XY. Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy – Strategies and perspectives. *Journal of Controlled Release* Vol 240: 489–503, 2016. doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.012
- [26]. Baetke SC, Lammers T and Kiessling F. Applications of nanoparticles for

- diagnosis and therapy of cancer. *Br J Radiol* 88: 20150207, 2015. doi:10.1259/bjr.20150207
- [27]. Fan Z, Fu PP, Yu H and Ray PC. Theranostic nanomedicine for cancer detection and treatment. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 22: 3-17, 2014. doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.001
- [28]. Kievit FM and Zhang M. Cancer Nanotheranostics: Improving Imaging and Therapy by Targeted Delivery across Biological Barriers. *Adv Mater*, 23: 217–247, 2011. doi:10.1002/adma.201102313
- [29]. Patel A, Patel M, Yang X, and Mitra AK. Recent Advances in Protein and Peptide Drug Delivery: A Special Emphasis on Polymeric Nanoparticles. *Protein Pept Lett*; 21: 1102–1120, 2014.
- [30]. Gdowski A, Ranjan A, Mukerjee A and Vishwanatha J. Development of Biodegradable Nanocarriers Loaded with a Monoclonal Antibody. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 3990-3995, 2015. doi:10.3390/ijms16023990
- [31]. Solaro R, Chiellini F and Battisti A. Targeted Delivery of Protein Drugs by Nanocarriers. *Materials* 3, 1928-1980, 2010. doi:10.3390/ma3031928
- [32]. Jeong JH, Park TG and Kim SH. Self-Assembled & Nanostructured siRNA Delivery Systems. *Pharmaceutical Research*, 28(9), 2072-2085, 2011. doi:10.1007/s11095-011-0412-y
- [33]. Mangraviti et al. Polymeric Nanoparticles for Nonviral Gene Therapy Extend Brain Tumor. *ACS Nano* 9 (2), 1236–1249, 2015. doi: 10.1021/nn504905q
- [34]. Veronese FM and Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today* 10: 1451–1458, 2005.
- [35]. Shi M, Luc J and Shoichet MS. Organic nanoscale drug carriers coupled with ligands for targeted drug delivery in cancer. *Journal. Mater. Chem.*, 19: 5485–5498, 2009. doi:10.1039/b822319j
- [36]. Zhao et al. Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* 5: 1–9, 2010.
- [37]. Yu et al. Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. *Mol Membr Biol.* 27(7): 286–298, 2010. doi:10.3109/09687688.2010.521200
- [38]. Kobayashi H, Watanabe R and Choyke PL. Improving conventional enhanced permeability and retention effect. *Theranostics*, 4:81-89, 2014.
- [39]. Yin H, Liao L, Fang J. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect Based Tumor Targeting: The Concept, Application and Prospect. *JSM Clin Oncol*

Res 2(1): 1010, 2014.

- [40]. Maeda H, Nakamura H and Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65: 71–79, 2013. doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.002
- [41]. Matsumura Y and Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer- chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 46:6387-92, 1986. doi: 10.7150/thno.7193
- [42]. Lollo G, Rivera-Rodríguez G, Torres D, y Alonso MJ. Nanoterapias oncológicas: aplicaciones actuales y perspectivas futuras. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 368: 76-98, 2011.
- [43]. Weissig V, Pettinger TK and Murdock N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *International Journal of Nanomedicine* 9: 4357–4373, 2014. doi.org/10.2147/IJN.S46900
- [44]. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, and Sparreboom A. "Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation," *European Journal of Cancer*, Vol. 37, no. 13, 1590–1598, 2001.
- [45]. Desai N et al. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, abi-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin Cancer Res*, 12:1317-1324, 2006. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1634
- [46]. Fukunaga-Kalabis M and Herlyn M. Unraveling mysteries of the multifunctional protein sparc. *J Invest Dermatol*, 127: 2497-2498, 2007. doi.org/10.1038/sj.jid.5701050
- [47]. Hawkins MJ, Soon-Shiong P and Desai N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv Drug Del Rev*, 60: 876-885, 2008. doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.044
- [48]. Schütz CA, Juillerat-Jeanneret L, Mueller H, Lynch I and Riediker M. Therapeutic nanoparticles in clinics and under clinical evaluation. *Nanomedicine* 8(3): 449–467, 2013. doi:10.2217/NNM.13.8
- [49]. Su-Eon Jin et al. Targeted Delivery System of Nanobiomaterials in Anticancer Therapy: From Cells to Clinics. *BioMed Research International*, Article ID 814208, 2014. doi.org/10.1155/2014/814208
- [50]. Danhier F et al. Strategies to improve the EPR effect for the delivery of

anti-cancer nanomedicines. *Cancer Cell & Microenvironment* 2: e808, 2015. doi:10.14800/ccm.808

[51]. Prabhakar et al. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention (EPR) effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res.* 73(8): 2412–2417, 2013. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4561

[52]. Nehoff H et al. Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. *International Journal of Nanomedicine* 9:2539–2555, 2014. doi.org/10.2147/IJN.S47129

[53]. Durymanov MO, Rosenkranz AA and Sobolev AS. Current Approaches for Improving Intratumoral Accumulation and Distribution of Nanomedicines. *Theranostics* 5(9): 1007-1020, 2015. doi: 10.7150/thno.11742

[54]. Arachchige et al. Advanced Targeted Nanomedicine. *J Biotechnol.* 202: 88–97, 2015. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.01.009

[55]. Laurent S and Mahmoudi M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2(4):367-390, 2011.

[56]. Boyer C, Whittaker MR, Bulmus V, Liu J and Davis TP. The design and utility of polymer-stabilized iron oxide nanoparticles for nanomedicine applications. *NPG Asia Mater.* 2(1) 23–30, 2010. doi: 10.1038/asiamat.2010.6

[57]. Grange C , Geninatti-Crich S , Esposito G , Alberti D , Tei L, Bussolati B , Aime S and Camussi G. Combined Delivery and Magnetic Resonance Imaging of Neural Cell Adhesion Molecule–Targeted Doxorubicin Containing Liposomes in Experimentally Induced Kaposi's Sarcoma. *Cancer Res*; 70(6), 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2821

[58]. Srinivasan M, Rajabi M and Mousa SA. Multifunctional Nanomaterials and Their Applications in Drug Delivery and Cancer Therapy. *Nanomaterials* 5: 1690-1703, 2015. doi:10.3390/nano5041690

[59]. Sun L et al. Strategies of polymeric nanoparticles for enhanced internalization in cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 135: 56–72, 2015. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.07.013

[60]. Wu X, Chen J, Wu M, Zhao JX. Aptamers: Active Targeting Ligands for Cancer Diagnosis and Therapy. *Theranostics* 5(4): 322-344, 2015. doi:10.7150/thno.10257

[61]. Zwicke GL et al. Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer

nanotherapeutics. Nano Reviews 3: 18496, 2012.

doi.org/10.3402/nano.v3i0.18496

[62]. Lencioni R, Cioni D. RFA plus lyso-thermosensitive liposomal doxorubicin: in search of the optimal approach to cure intermediate-size hepatocellular carcinoma Hepatic Oncology. Published online June 10, 2016. doi:10.2217/hep-2016-0005

[63]. Marqués-Gallego P and Kroon AIPM. Ligation Strategies for Targeting Liposomal Nanocarriers. BioMed Research International Vol. 2014, Article ID 129458, 2014. doi.org/10.1155/2014/129458

[64]. Karra N and Benita S. The Ligand Nanoparticle Conjugation Approach for Targeted Cancer Therapy. Current Drug Metabolism Vol. 13: 22-41, 2012. doi:10.2174/138920012798356899

[65]. Werengowska-Cieciewicz K et al. The Chemistry of Bioconjugation in Nanoparticles-Based Drug Delivery System. Advances in Condensed Matter Physics Vol, 2015, Article ID 198175, 2015. doi.org/10.1155/2015/198175

[66]. Kim JH and Yoon JY. Protein adsorption on polymer particles. Encyclopedia of Surface and Colloid Science, 2002.

[67]. Bertrand N et al. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. Adv. Drug Deliv. Rev; 2013. doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009

[68]. Lu Y and Low PS. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. Advanced Drug Delivery Reviews 54: 675–693, 2002.

[69]. Low PS, Kularatne SA. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. Current Opinion in Chemical Biology 3: 256-62, 2009. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.03.022

[70]. Lutz RJ. Targeting the folate receptor for the treatment of ovarian cancer. Translational Cancer Research 4(1): 118-126, 2015. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2015.01.04

[71]. Choi KY et al. Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: Interfacial interactions with proteins in cancer. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 99: 82– 94, 2012. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.10.029

[72]. Arruebo M, Valladares M and González-Fernández A. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications. Journal of Nanomaterials Vol. 2009, Article ID 439389, 2009. doi:10.1155/2009/439389

[73]. Gerber H-P, Senter PD and Grewal IS. Antibody drug-conjugates targeting

- the tumor vasculature: Current and future developments. *mAbs*. 1(3):247-253, 2009. doi:10.4161/mabs.1.3.8515
- [74]. Xu S et al. Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: rationale and advances. *Adv Drug Deliv Rev*. 65(1):121–138, 2013. doi:10.1016/j.addr.2012.09.041.
- [75]. Löw K, Wacker M, Wagner S, Langer K and von Briesen H. Targeted human serum albumin nanoparticles for specific uptake in EGFR-Expressing colon carcinoma cells. *Nanomedicine: NBM* xx: 1-10, 2011. doi:10.1016/j.nano.2010.12.003
- [76]. Sun B et al. Multifunctional poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer. *Biomaterials* 29: 475–486, 2008. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.09.038
- [77]. Gilad Y, Firer M and Gellerman G. Recent Innovations in Peptide Based Targeted Drug Delivery to Cancer Cells. *Biomedicines* 4 (11), 2016. doi:10.3390/biomedicines4020011
- [78]. Wang F, Li Y, Shen Y, Wang A, Wang S and Xie T. The Functions and Applications of RGD in Tumor Therapy and Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 13447-13462, 2013. doi:10.3390/ijms140713447
- [79]. Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, Tran TN, LaVan DA and Langer R. Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates: A New Approach for Targeting Prostate Cancer Cells. *Cancer Research* 64: 7668 –7672, 2004.
- [80]. Leonhard V, Alasino RV, Bianco ID, Garro AG, Heredia V and Beltramo DM. Self-assembled micelles of monosialogangliosides as nanodelivery vehicles for taxanes. *Journal of Controlled Release* 162: 619–627, 2012. doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.031
- [81]. Leonhard V, Alasino RV, Bianco ID, Garro AG, Heredia V and Beltramo DM. Biochemical characterization of the interactions between doxorubicin and lipidic GM₁ micelles with or without paclitaxel loading. *International Journal of Nanomedicine* 10: 3377–3388, 2015. doi.org/10.2147/IJN.S77153
- [82]. Heredia V, Alasino RV, Leonhard V, Garro AG, Maggio B and Beltramo DM. Sialoganglioside Micelles for Enhanced Paclitaxel Solubility: In Vitro Characterization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105: 268-275, 2016. doi.org/10.1016/j.xphs.2015.10.029
- [83]. Leonhard V, Alasino RV, Bianco ID, Garro AG, Heredia V and Beltramo DM.

Biochemical Characterization of GM₁ Micelles-Amphotericin B Interaction. *Current Drug Delivery* Vol. 12, No. 0, 2015.

[84]. Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*, 17 (1) 1-13, 2006. doi:10.1093/glycob/cwl052

[85]. Kolter T. Ganglioside Biochemistry. *International Scholarly Research Network ISRN Biochemistry* Vol. 2012, Article ID 506160, 2012. doi:10.5402/2012/506160

[86]. Ulrich-Bott B, Wiegandt H. Micellar properties of glycosphingolipids in aqueous media. *J Lipid Res*, 25: 1233-1245, 1984.

[87]. Formisano S, Johnson ML, Lee G, Aloj SM, Edelhofer H. Critical Micelle Concentrations of Gangliosides. *Biochemistry*, 18 (6) 1119-1124, 1979. doi:10.1021/bi00573a028

[88]. Chandler D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature*, Vol 437: 640-647, 2005. doi:10.1038/nature04162

[89]. Schengrund CL. Gangliosides: glycosphingolipids essential for normal neural development and function. *Cell Press: Trends in Biochemical Sciences* 40(7):397-406, 2015.

[90]. Yu RK, Tsai YT and Ariga T. Functional roles of gangliosides in neurodevelopment—An overview of recent advances. *Neurochem Res*. 37(6): 1230–1244, 2012.

[91]. Yu et al. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides - An overview. *J Oleo Sci*. 60(10): 537–544, 2011.

[92]. Posse de Chaves E, Sipione S. Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Letters* 584: 1748–1759, 2010. doi:10.1016/j.febslet.2009.12.010

[93]. Morris NP, Consiglio E, Kohn LD, Habig WH, Hardegree MC and Helting TB. Interaction of Fragments B and C of Tetanus Toxin with Neural and Thyroid Membranes and with Gangliosides. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 255(13): 6071-6076, 1980.

[94]. van Buuren MM. Sialic acid as a receptor for viruses and bacterial toxins. *Biomedical Sciences – Immunity & Infection*, 2009.

[95]. Tyurin VA, Tyurina YY, Avrova N. Ganglioside-dependent factor, inhibiting lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Int*, 20: 401-407, 1992.

[96]. Avrova NF, Zakharov IO, Tyurin VA, Tyurina YY, Gamaley IA, et al.

Different metabolic effects of ganglioside GM₁ in brain synaptosomes and phagocytic cells. *Neurochem Res*, 27: 751-759, 2002.

[97]. Ledeen R, Wu G. New findings on nuclear gangliosides: overview on metabolism and function. *J Neurochem*. 116(5):714–720, 2011. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07115.x

[98]. Ariga T, McDonald MP and Yu RK. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease—a review. *Journal of Lipid Research* Vol 49:1157-1175, 2008.

[99]. Mocchetti I. Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*. 62: 2283–2294, 2005.

[100]. Skaper SD, Leon A and Toffano G. Ganglioside Function in the Development and Repair of the Nervous System. *Molecular Neurobiology* Vol 3:173-199, 1989.

[101]. Li S, Xiao N, Zhang X, et al. Effects of exogenous ganglioside-1 on learning and memory in a neonatal rat model of hypoxia-ischemia brain injury. *Neural Regen Res*. 3(9):1004–1009, 2008.

[102]. Zou et al. Penetration of blood–brain barrier and antitumor activity and nerve repair in glioma by doxorubicin-loaded monosialoganglioside micelles system. *International Journal of Nanomedicine* 12: 4879–4889, 2017.

[103]. Wu G, Lu ZH, Kulkarni N, Amin R, Ledeen RW. Mice lacking major brain gangliosides develop Parkinsonism. *Neurochem Res*. 36(9): 1706–1714, 2011.

[104]. Miazek K., Lebecque S., Hamaidia M. et al. Sphingolipids: promising lipid-class molecules with potential applications for industry. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 20(S1): 321-336, 2016.

[105]. WO2011113981 A1. Inventores: Beltramo D, Leonhard V, Alasino RV, Bianco I. Doc Type: Patent Application ID: lens.org/008-873-544-655-106. Water-soluble pharmaceutical composition comprising at least one therapeutically active substance having hydrophobic properties and at least one compound selected from among sialoglycosphingolipids, glycosphingolipids or a mixture of sialoglycosphing, 2011.

[106]. Leonhard et al. Selective Binding of Albumin to GM₁ Ganglioside Micelles Containing Paclitaxel. *J Nanomed Nanotechol* 4: 159, 2013. doi.org/10.4172/2157-7439.1000159

[107]. Pegg AE. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*; 61: 880-894, 2009.

- [108]. Casero RA, Nowotarski SL, Woster PM. Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. Expert reviews in molecular medicine. University Press; Cambridge 2013.
- [109]. Casero RA, Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 6: 373-390, 2007.
- [110]. Esteves-Souza A, Rocha GC, Araujo LK, et al. Antitumoral activity of new polyaminenaphthoquinone conjugates. *Oncol Rep* 20: 225-231, 2008.
- [111]. Martinez ME, O'Brien TG, Fultz KE, et al. Pronounced reduction in adenoma recurrence associated with aspirin use and a polymorphism in the ornithine decarboxylase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 7859-7864, 2003.
- [112]. Gerner EW, Meyskens FL. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer* 4: 781-792, 2004.
- [113]. Soda K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J Exp Clin Cancer Res* 30:95, 2011.
- [114]. Palmer AJ and Wallace HM. The polyamine transport system as a target for anticancer drug development. *Amino Acids* 38 (2):415-422, 2010.
- [115]. D'Agostino L. Polyamine uptake by human colon carcinoma cell line CaCo-2. *Digestion* 46 Suppl 2: 352-9, 1990.
- [116]. Morgan DM. Uptake of polyamines by human endothelial cells. Characterization and lack of effect of agonists of endothelial function. *Biochem J* 286: 413-417, 1992.
- [117]. Palmer AJ, Ghani RA, Kaur N, Phanstiel O, Wallace HM. A putrescine-anthracene conjugate: a paradigm for selective drug delivery. *Biochem J* 424: 431-8, 2009.
- [118]. Holley JL, Mather A, Wheelhouse RT, et al. Targeting of Tumor Cells and DNA by a Chlorambucil-Spermidine Conjugate. *Cancer Res* 52: 4190-4195, 1992.
- [119]. Seiler N. Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 2. Structural analogues and derivatives. *Curr Drug Targets* 4: 565-85, 2003.
- [120]. Porter CV, Bergeron RJ, Stolowich NJ. Biological properties of N4-spermidine derivatives and their potential in anticancer chemotherapy. *Cancer Res* 42: 4072-4078, 1982.
- [121]. Hermanson GT. Bioconjugate Techniques, Academic Press; London 1996.

- [122]. Raspaud E, de la Cruz OM, Sikorav JL, Livolant F. Precipitation of DNA by Polyamines: A Polyelectrolyte Behavior. *Biophys J* 74: 381-393, 1998.
- [123]. Honga K, Zhenga W, Bakerb A, Papahadjopoulousa D. Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery. *FEBS Letters* 400: 233-237, 1997.
- [124]. Azzama T, Eliyahua H, Makovitzkia A, Linialb M, Domb AJ. Hydrophobized dextran-spermine conjugate as potential vector for in vitro gene transfection. *J Cont Release* 96: 309-323, 2004.
- [125]. Kim B-K, Seu Y-B, Bae Y-U, et al. Efficient Delivery of Plasmid DNA Using Cholesterol-Based Cationic Lipids Containing Polyamines and Ether Linkages. *Int J Mol Sci* 15: 7293-7312, 2014.
- [126]. Vijayanathan V, Agostinelli E, Thomas T, Thomas TJ. Innovative approaches to the use of polyamines for DNA nanoparticle preparation for gene therapy. *Amino Acids* 46 (3): 499-509, 2014.
- [127]. Viola BM, Abraham TE, Arathi DS, Sreekumar E, Pillai MR, Thomas TJ, Pillai CKS. Synthesis and characterization of novel water-soluble polyamide based on spermine and aspartic acid as a potential gene delivery vehicle. *Exp Poly Lett* 2 (5): 330-338, 2008.
- [128]. Blagbrough IS, Geall AJ, Neal AP. Polyamines and novel polyamine conjugates interact with DNA in ways that can be exploited in non-viral gene therapy. *Biochem Soc Trans* 31(2): 397-406, 2003.
- [129]. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 376: 1-14, 2003.
- [130]. Phanstiel O, Kaur N and Delcros JG. Structure-activity investigations of polyamine-anthracene conjugates and their uptake via the polyamine transporter. *Amino Acids* 33: 305-313, 2007. doi:10.1007/s00726-007-0527-y
- [131]. Holley J, Mather A, Cullis P, Symons MR, Wardman P, Watt RA, Cohen GM. Uptake and cytotoxicity of novel nitroimidazolepolyamine conjugates in Ehrlich ascites tumour cells. *A Biochem Pharmacol* 43(4):763-9, 1992.
- [132]. Criss WE. A Review of Polyamines and Cancer. *Turk J Med Sci* 33: 195-205, 2003.
- [133]. Ehrlich P. Collected studies on immunity. New York: J. Wiley & Sons, 1906.
- [134]. Blanco et al. Multifunctional Micellar Nanomedicine for Cancer Therapy.

Exp Biol Med 234(2): 123–131, 2009. doi:10.3181/0808-MR-250

[135]. Kocbek P et al. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *Journal of Controlled Release* 120, 18–26, 2007. doi:10.1016/j.jconrel.2007.03.012

[136]. Balthasar S et al. Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes. *Biomaterials* 26: 2723–2732, 2005. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.07.047

[137]. Yousefpour et al. Targeted delivery of doxorubicin-utilizing chitosan nanoparticles surface-functionalized with anti-Her2 trastuzumab. *International Journal of Nanomedicine* 6, 1977–1990, 2011. doi.org/10.2147/IJN.S21523

[138]. Yu MK, Park J. and Jon S. Targeting Strategies for Multifunctional Nanoparticles in Cancer Imaging and Therapy. *Theranostics* 2(1), 3-44, 2012. doi: 10.7150/thno.3463

[139]. Fahmy TM, Fong PM, Goyal A and Saltzman WM. Targeted for drug delivery, *Mater. Today* 8 (8), 18–26, 2005.

[140]. Torchillin VP et al. Immunomicelles: Targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *PNAS* 100 (10), 6039-6044, 2003. doi:10.1073/pnas.0931428100

[141]. Löw K, Wacker M, Wagner S, Langer K and von Briesen H. Targeted human serum albumin nanoparticles for specific uptake in EGFR-Expressing colon carcinoma cells. *Nanomedicine: NBM*; xx: 1-10, 2011. doi:10.1016/j.nano.2010.12.003

[142]. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L & Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951.

[143]. Vermeer AWP and Norde W. The Thermal Stability of Immunoglobulin: Unfolding and Aggregation of a Multi-Domain Protein. *Biophysical Journal* Vol 78: 394-404, 2000.

[144]. Vermeer AWP et al. The Unfolding/Denaturation of Immunoglobulin of Isotype 2b and Its Fab and Fc Fragments. *Biophysical Journal* Vol 79: 2150-2154, 2000.

[145]. Cantú L, Corti M, Del Favero E, Muller E, Raudino A, Sonnino S. Thermal hysteresis in ganglioside micelles investigated by differential scanning calorimetry and light-scattering. *Langmuir* 15: 4975–4980, 1999. doi:10.1021/la981355n

[146]. Hirai M and Takizawa T. Intensive extrusion and occlusion of water in

ganglioside micelles with thermal reversibility. *Biophysical Journal* 74: 3010–3014, 1998.

[147]. Orthaber D, Glatter O. Time and temperature dependent aggregation behavior of the ganglioside GM₁ in aqueous solution. *Chem. Phys. Lipids*, 92(1): 53-62, 1998. doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00010-3

[148]. Scott AM, Wolchok and Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* 12: 278-287. 2012. doi:10.1038/nrc3236

[149]. Trail PA. Antibody Drug Conjugates as Cancer Therapeutics. *Antibodies* 2: 113-129, 2013. doi:10.3390/antib2010113

[150]. Weiner LM, Surana R and Wang S. Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 10(5): 317–327, 2010. doi:10.1038/nri2744

[151]. Sharkey RM and Goldenberg DM. Targeted Therapy of Cancer: New Prospects for Antibodies and Immunoconjugates. *CA Cancer J Clin* 56:226–243, 2006.

[152]. Van Berkel TJ. Drug targeting: application of endogenous carriers for site specific delivery of drug. *Journal of Controlled Release* 24: 145–155, 1993.

[153]. Kader A and Pater A. Loading anticancer drugs into HDL as well as LDL has little affect on properties of complexes and enhances cytotoxicity to human carcinoma cells. *Journal of Controlled Release* 80: 29–44, 2002.

[154]. Lou B, Liao XL, Wu MP, Cheng PF, Yin CY, Fei Z. High-density lipoprotein as a potential carrier for delivery of a lipophilic antitumoral drug into hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 11(7): 954-959, 2005.

[155]. Lacko AG, Sabnis NA, Nagarajan B and McConathy WJ. HDL as a drug and nucleic acid delivery vehicle. *Front. Pharmacol*. 6: 247, 2015. doi:10.3389/fphar.2015.00247

[156]. Kader A et al. Drug targeting using low density lipoprotein (LDL): physicochemical factors affecting drug loading into LDL particles. *Journal of Controlled Release* 55: 231–243, 1998.

[157]. Foroozesh M and Zarrin A. A Safe, Versatile and Translation-prone Strategy for Using Circulating Lipoproteins as Endogenous Drug Delivery Systems. *Irn J Med Hypotheses Ideas* 4: 15, 2010.

[158]. Ng KK et al. Lipoprotein-Inspired Nanoparticles for Cancer Theranostics. *Accounts of Chemical Research*, Vol. 44(10): 1105–1113, 2011. doi:10.1021/ar200017e

- [159]. Goldstein JL and Brown MS. The Low-Density Lipoprotein Pathway and Its Relation to Atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry*, 46: 897-930, 1977. doi.org/10.1146/annurev.bi.46.070177.004341
- [160]. Brown MS and Goldstein JL. Receptor-mediated endocytosis: Insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol. 76, No. 7, pp. 3330-3337, 1979.
- [161]. Gal D, Ohashi M, MacDonald PC, Buchsbaum HJ and Simpson ER. Low-density lipoprotein as a potential vehicle for chemotherapeutic agents and radionuclides in the management of gynecologic neoplasms. *Am. J. Obstet. Gynecol.* Vol. 139: 877-885, 1981.
- [162]. Filipowska D, Filipowski T, Morelowska B, Kazanowska W, Laudanski T, Lapinjoki S, Akerlund M and Breeze A. Treatment of cancer patients with a low-density-lipoprotein delivery vehicle containing a cytotoxic drug. *Cancer Chemother Pharmacol.* 29: 396-400, 1992.
- [163]. Firestone RA. Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting antitumor compounds to cancer cells. *Bioconjugate Chem* 5(2): 105-113, 1994.
- [164]. Glickson JD et al. Lipoprotein Nanoplatfrom for Targeted Delivery of Diagnostic and Therapeutic Agents. *Molecular Imaging*, Vol 7 (2): 101-110, 2008. doi:10.2310/7290.2008.0012
- [165]. Bijsterbosch MK, Schouten D, van Berkel TJ. Synthesis of the dioleoyl derivative of iododeoxyuridine and its incorporation into reconstituted high density lipoprotein particles. *Biochemistry* 33: 14073-14080, 1994.
- [166]. Lacko AG, Nair M, Paranjape S, Johnson S and McConathy WJ. High Density Lipoprotein Complexes as Delivery Vehicles for Anticancer Drugs. *Anticancer Research* 22: 2045-2050, 2002.
- [167]. Kuai R, Li D, Chen YE, Moon JJ and Schwendeman A. High-Density Lipoproteins: Nature's Multifunctional Nanoparticles. *ACS Nano*, 10 (3): 3015-3041, 2016. doi:10.1021/acsnano.5b07522
- [168]. Mooberry LK, Sabnis NA, Panchoo M, Nagarajan B and Lacko AG. Targeting the SR-B1 Receptor as a Gateway for Cancer Therapy and Imaging. *Front. Pharmacol.* 7(466), 2016. doi:10.3389/fphar.2016.00466
- [169]. McMahon KM et al. Synthetic High-Density Lipoprotein-Like Nanoparticles as Cancer Therapy. *Cancer Treat Res.* 166: 129-150, 2015. doi:10.1007/978-3-319-16555-4_6
- [170]. Wang J, Jia J, Liu J, He H , Zhang H , and Li Z. Tumor targeting effects of

a novel modified paclitaxel-loaded discoidal mimic high density lipoproteins. *Drug Deliv*, 20(8): 356–363, 2013. doi:10.3109/10717544.2013.834418

[171]. Tripathy S, Vinokour E, McMahon KM, Volpert OV and Thaxton CS. High Density Lipoprotein Nanoparticles Deliver RNAi to Endothelial Cells to Inhibit Angiogenesis. *Part Part Syst Charact*. 31(11): 1141–1150, 2014.

[172]. Prokazova NV, Mikhailenko IA, Preobrazhensky SN, Ivanov VO, Pokrovsky SN, Timofeeva NG, Martinova MA, Repin VS and Bergelson LD. Interaction gangliosides with plasma low density proteins. *Glycoconjugate J*. 3, 273-286, 1986. doi:10.1007/BF01051777

[173]. Rebbaa A and Portoukalian J. Distribution of exogenously added gangliosides in serum proteins depends on the relative affinity of albumin and lipoproteins. *Journal of Lipid Research* 36: 564-572, 1995.

[174]. Mikhailenko IA, Dubrovskaya SA, Korepanova OB, Timofeeva NG, Morozkin AD, Prokazova NV and Bergelson LD. Interaction of low-density lipoproteins with gangliosides. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 1085(3): 299-305, 1991. doi.org/10.1016/0005-2760(91)90133-3

[175]. Filipovic I, Schwarzmann G, Mraz W, Wiegandt H and Buddecke E. Sialic-Acid Content of Low-Density Lipoproteins Controls Their Binding and Uptake by Cultured Cells. *Eur. J. Biochem*. 93: 51 -55, 1979.

[176]. Burstein M, Scholnick HR, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res*. 11(6): 583-95, 1970.

[177]. Kamps JAAM, Kruijt JK, Kuiper J and Van Berkel TJC. Uptake and degradation of human low-density lipoprotein by human liver parenchymal and Kupffer cells in culture. *Biochem. J*. 276: 135-140, 1991.

[178]. Illingworth DR, Lindsey S and Hagemenas FC. Regulation of Low-density Lipoprotein Receptors in the Human Hepatoma Cell Line Hep G2. *Experimental Cell Research* 155: 518-526, 1984.

[179]. Schouten D, van der Kooij M, Muller J, Pieters MN, Bijsterbosch MK and van Berkel TJ. Development of lipoprotein-like lipid particles for drug targeting: neo-high density lipoproteins. *Mol Pharmacol*. 44(2):486-92, 1993.

[180]. Counsell RE and Pohland RC. Lipoproteins as Potential Site-Specific Delivery Systems for Diagnostic and Therapeutic Agents. *J. Med. Chem*. 25: 1115–1120, 1982. doi:10.1021/jm00352a001

- [181]. Brown MS and Goldstein JL. Regulation of the Activity of the Low Density Lipoprotein Receptor in Human Fibroblasts. *Cell*, Vol. 6: 307-316, 1975.
- [182]. Havekes LM, Verboom H, De Wit E, Yap SH and Princen HMG. Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Activity in Primary Cultures of Human Hepatocytes by Serum Lipoproteins. *Hepatology* Vol. 6 (6): 1356-1360, 1986.
- [183]. Versluis AJ et al. Receptor-mediated uptake of low-density lipoprotein by B16 melanoma cells in vitro and in vivo in mice. *British Journal of Cancer* 74: 525-532, 1996.
- [184]. Lombardi P, Mulder M, De Wit E, Van Berkel TJC, Frants RR and Havekes LM. Low-density lipoproteins are degraded in HepG2 cells with low efficiency.
- [185]. Edge SB, Hoeg JM, Triches T, Schneider PD and Brewer HB. Cultured Human Hepatocytes. Evidence for Metabolism of Low Density Lipoproteins by a Pathway Independent of the Classical Low Density Lipoprotein Receptor. *J. Biol. Chem.* Vol. 261(8): 3800-3806, 1986.
- [186]. Shaw JM, Shaw KV, Yanovich S, Iwanik M, Futch WS, Rosowsky A and Schook LB. Delivery of lipophilic drugs using lipoproteins, *Ann. NY Acad. Sci.* 507: 252-271, 1987. doi:10.1111/j.1749-6632.1987.tb45806.x
- [187]. Zhao X, Li H and Lee RJ. Targeted drug delivery via folate receptors. *Expert Opin. Drug Deliv.* 5(3):309-319, 2008. doi:10.1517/17425247.5.3.309
- [188]. Marchetti C et al. Targeted drug delivery via folate receptors in recurrent ovarian cancer: a review. *OncoTargets and Therapy* 7: 1223-1236, 2014. doi.org/10.2147/OTT.S40947
- [189]. Leamon CP and Low PS. Delivery of macromolecules into living cells: A method that exploits folate receptor endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 88: 5572-5576, 1991.
- [190]. Leamon CP and Low PS. Cytotoxicity of Momordin-Folate Conjugates in Cultured Human Cells. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 267(35): 24966-24971, 1992.
- [191]. Yoo HS and Park TG. Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nano-aggregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate. *J Control Release.* 100(2):247-56, 2004.
- [192]. Aronov O, Horowitz AT, Gabizon A and Gibson D. Folate-Targeted PEG as a Potential Carrier for Carboplatin Analogs. *Synthesis and in Vitro Studies. Bioconjugate Chem.* 14: 563-574, 2003. doi:10.1021/bc025642l

- [193]. Reddy JA, Westrick E, Vlahov, Howard SJ, Santhapuram HK and Leamon CP. Folate receptor specific anti-tumor activity of folate–mitomycin conjugates. *Cancer Chemother Pharmacol.* 58: 229–236, 2006. doi:10.1007/s00280-005-0151-z
- [194]. Suzuki T et al. Design, synthesis, and biological activity of folate receptor-targeted prodrugs of thiolate histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 4208–4212, 2007. doi:10.1016/j.bmcl.2007.05.040
- [195]. Henne WA, Doorneweerd DD, Hilgenbrink AR, Kularatne SA and Low PS. Synthesis and activity of a folate peptide camptothecin prodrug. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16: 5350–5355, 2006. doi:10.1016/j.bmcl.2006.07.076
- [196]. Liu J, Kolar C, Lawson TA and Gmeiner WH. Targeted drug delivery to chemoresistant cells: folic acid derivatization of FdUMP [10] enhances cytotoxicity toward 5-FU-resistant human colorectal tumor cells. *J Org Chem.* 66(17): 5655-63, 2001. 10.1021/jo005757n
- [197]. Leamon CP, Reddy JA, Vlahov IR, Kleindl PJ, Vetzal M and Westrick E. Synthesis and Biological Evaluation of EC140: A Novel Folate-Targeted Vinca Alkaloid Conjugate. *Bioconjugate Chem.* 17: 1226–1232, 2006. doi:10.1021/bc060145g
- [198]. Hayama A et al. Polymeric Micelles Modified by Folate-PEG-Lipid for Targeted Drug Delivery to Cancer Cells In Vitro. *J. Nanosci. Nanotechnol.* Vol. 8: 1-6, 2007. doi:10.1166/jnn.2007.093
- [199]. Yoo HS and Park TG. Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *Journal of Controlled Release* 96: 273–283, 2004. doi:10.1016/j.jconrel.2004.02.003
- [200]. Zhao D et al. Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* 5: 1–9, 2010.
- [201]. Stevens PJ, Sekido M and Lee RJ. A Folate Receptor–Targeted Lipid Nanoparticle Formulation for a Lipophilic Paclitaxel Prodrug. *Pharmaceutical Research* Vol. 21(12), 2153-2157, 2004.
- [202]. Ren D, Kratz F and Wang SW. Engineered drug-protein nanoparticle complexes for folate receptor targeting. *Biochem Eng J.* 89: 33–41, 2014. doi:10.1016/j.bej.2013.09.008.
- [203]. Wang X et al. HFT-T, a Targeting Nanoparticle, Enhances Specific Delivery

of Paclitaxel to Folate Receptor-Positive Tumors. *ACS Nano*. 3(10): 3165–3174, 2009. doi:10.1021/nn900649v.

[204]. Gabizon A, Shmeeda H, Horowitz AT and Zalipsky S. Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56: 1177– 1192, 2004. doi:10.1016/j.addr.2004.01.011

[205]. Yang T, Li B, Qi S, Liu Y, Gai Y, Ye P, Yang G, Zhang W, Zhang P, He X, Li W, Zhang Z, Xiang G, Xu C. Co-delivery of Doxorubicin and Bmi1 siRNA by Folate Receptor Targeted Liposomes Exhibits Enhanced Anti-Tumor Effects in vitro and in vivo. *Theranostics* 4(11):1096-1111, 2014. doi:10.7150/thno.9423

[206]. Noble GT, Stefanick JF, Ashley JD, Kiziltepe T and Bilgicer B. Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends in Biotechnology* Vol. 32: 32-45, 2014. doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.09.007

[207]. Goren D, Horowitz AT, Tzemach D, Tarshish M, Zalipsky S and Gabizon A. Nuclear Delivery of Doxorubicin via Folate-targeted Liposomes with Bypass of Multidrug-resistance Efflux Pump. *Clinical Cancer Research* Vol. 6: 1949–1957, 2000.

[208]. Wang X et al. A Folate Receptor-Targeting Nanoparticle Minimizes Drug Resistance in a Human Cancer Model. *ACS Nano*. 5(8): 6184–6194, 2011. doi:10.1021/nn200739q.

[209]. Feng X, Lv F, Liu L, Tang H, Xing Ch, Yang Q and Wang S. Conjugated Polymer Nanoparticles for Drug Delivery and Imaging. *Materials & Interfaces* Vol. 8): 2429–2435, 2010. doi:10.1021/am100435k

[210]. Duncan R. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature Reviews* Vol 6:688-701, 2006. doi:10.1038/nrc1958

[211]. Shi M, Ho K, Keating A and Shoichet MS. Doxorubicin-Conjugated Immuno-Nanoparticles for Intracellular Anticancer Drug Delivery. *Adv. Funct. Mater.* Vol 19: 1-8, 2009. doi:10.1002/adfm.200801271

[212]. Peters C and Brown S. Antibody–drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Bioscience Reports* 35 art:e00225, 2015. doi:10.1042/BSR20150089.

